

AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS DE LAVANDULA SPP. NO CONTROLO DE MICRORGANISMOS

Rita Eduardo Jorge

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Agrónómica – Proteção de Plantas

Orientadora: Doutora Maria Helena Mendes da Costa Ferreira Correia de Oliveira

Co-orientadora: Doutora Generosa Maria Manso Teixeira Xavier

Júri:

Presidente: Doutora Maria José Antão Pais de Almeida Cerejeira, Professora Associada com Agregação do Instituto Superior de Agronomia

Vogais: Doutora Ana Maria da Silva Monteiro, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia

Doutora Generosa Maria Mando Teixeira Xavier, Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Helena Oliveira e à Professora Doutora Generosa Teixeira por toda a orientação, ajuda, ensinamentos e paciência ao longo deste tempo e pela revisão do manuscrito.

À Doutora Ana Margarida Madureira que me ensinou tudo o que precisava de saber, ajudou e acompanhou ao longo da estadia na FFUL.

À Doutora Leonor Cruz, Professora Doutora Sara Amâncio, Mestre Teresa Nascimento, Doutora Aida Duarte, Doutora Maria Manuel Lopes e respetivas equipas, que me abriram as portas dos seus laboratórios e cederam material, sempre com um sorriso.

À Doutora Ana Caperta que me incentivou no mundo da investigação e das lavandas em particular, e que sugeriu o tema desta dissertação.

Aos meus colegas e amigos, em especial Filipa Canaveira, Pedro Reis, Andreia Cabanas, Pedro Coelho e João Reis, que estiveram sempre interessados e a dar apoio.

Ao Mário por toda a paciência e carinho durante todos estes anos de estudo.

E por fim, à minha família, em especial aos meus pais por todos os sacrifícios e por me terem tornado no que sou hoje.

Muito obrigada a todos!

Resumo

A flora portuguesa é muito rica em plantas aromáticas e medicinais, dentre as quais se encontra *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* e *L. pedunculata*. O presente estudo teve como objetivo avaliar a potencial atividade antimicrobiana de óleos essenciais (OE) e de cinco extratos vegetais das espécies referidas, relativamente a agentes patogénios do Homem e de plantas. Os óleos essenciais foram extraídos a partir de material seco, por hidrodestilação e os extratos por um sistema de solventes de polaridade crescente. Foi utilizado o micrométodo para avaliação dos patogénios do Homem e determinada a concentração mínima inibitória (CMI), tendo as amostras sido testadas em diferentes concentrações: 7,5; 15,5; 31; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL. Os resultados foram considerados positivos quando CMI < 100 µg/mL. As espécies evidenciaram diferentes propriedades antimicrobianas, atribuídas à diferente composição química dos respetivos OE e extratos. Para as bactérias fitopatogénicas foi igualmente utilizado o micrométodo e para os fungos recorreu-se ao método da difusão por discos em meio sólido, inoculado por sementeira de esporos e por discos de micélio, utilizando amostras com concentrações de 1 mg/mL e 2 mg/mL, respetivamente. Não foi verificada qualquer inibição de crescimento para os agentes fitopatogénicos. O presente estudo tende a confirmar o uso de OE e extratos vegetais no controlo de diferentes tipos de microrganismos patogénicos.

Palavras-chave:

Lavandula stoechas subsp. *luisieri*, *L. pedunculata*, óleos essenciais, extratos, atividade antimicrobiana

Abstract

The Portuguese flora is very rich in aromatic and medicinal plants, among which are *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* and *L. pedunculata*. The present study was aimed to evaluate the potential antimicrobial activity of five plant extracts and essential oils (EO) obtained from these species, with respect to human and plant pathogens. The EO were extracted from dried material by hydrodistillation and the extracts by a solvent system of increasing polarity. To evaluate the activity of samples against human pathogens the microdilution method was used and determined the values of minimum inhibitory concentration (MIC) at different concentrations: 7.5, 15.5, 31, 62.5, 125, 250 and 500 µg/mL. Results were considered positives for MIC values < 100 µg/mL. *Lavandula* species showed different antimicrobial properties, attributed to differences in the chemical composition of the respective EO and extracts. For phytopathogenic bacteria a similar procedure was followed. Regarding the fungi, the activity of EO and extracts was evaluated by the disc diffusion method on solid medium inoculated with spore suspensions or mycelial discs at sample concentration of 1 mg/mL and 2 mg/mL, respectively. None of the plant pathogens was inhibited. This study tends to confirm the use of EO and plant extracts to control different types of microbial pathogens.

Keywords:

Lavandula stoechas subsp. *luisieri*, *L. pedunculata*, essential oils, extracts, antimicrobial activity

Extended Abstract

Essential oils and extracts of different polarities obtained from members of the genus *Lavandula* (Lamiaceae) have been used both cosmetically and therapeutically for centuries. They are widely known for their richness in bioactive compounds, some of which revealing antimicrobial activities. The *Flora Iberica* refers the existence of eight species and some subspecies of the genus *Lavandula* in the Iberian Peninsula, which includes *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* (Rozeira) Rozeira and *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cavanille as native plants of Portugal. These native *taxa*, mainly known as aromatic plants, have received much lesser attention than other species of this genus (ex., *L. angustifolia*) in what concerns their chemical composition and biological activity.

This study was aimed to evaluate the potential antibacterial and antifungal activities of the essential oils (EO), as well as five different extracts obtained from *L. stoechas* subsp. *luisieri* and *L. pedunculata* against selected human and plant pathogens.

The EO were obtained from dried plant material by hydrodistillation, and the extracts were prepared by extracting sequentially in solvents of increasing polarity. Broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs) of EO and extracts. This is a reference method which represents the lowest concentration of an antimicrobial agent that, under defined *in vitro* conditions, prevents the appearance of visible growth of a microorganism within a defined period of time. Compounds with MIC values lower than 100 µg/mL are usually considered as active and therefore could be regarded as promising candidates for further studies.

Bacillus subtilis, *Enterococcus hirae*, *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Mycobacterium smegmatis* were selected among bacterial human pathogens to be tested, and *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilopsis*, *Rhodotorula rubra*, *Trichosporon cutaneum* and *Cryptococcus neoformans* among fungi human pathogens. Also *Saccharomyces cerevisiae*, an useful yeast, was included in the study for comparative purposes. Antifungal and antibacterial standard compounds were used as positive controls.

The fungi *A. niger*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. neoformans*, *R. rubra*, *T. cutaneum* and the Gram-positive bacterium *S. aureus* (ATCC 6538) showed sensitivity to samples (EO and extracts) of *L. stoechas* subsp. *luisieri*. In turn, samples of *L. pedunculata* only inhibited the fungi *C. guilliermondii*, *C. neoformans*, *R. rubra* and *T. cutaneum*, as well as *S. aureus* (ATCC 6538), thereby revealing a narrow-spectrum of antimicrobial activity, as compared to samples of *L. stoechas* subsp. *luisieri*. These results could be justified by the different chemical composition of EO and extracts.

Cryptococcus neoformans revealed to be the most sensitive pathogen, being inhibited by EO and extracts of both plant species. Gram-negative bacteria were not inhibited by any of the samples, which may be related to the complex structure of the cell wall of these bacteria as compared to Gram-positive bacteria.

None of the *Lavandula* spp. samples, at the tested concentrations, showed antibacterial activity against Gram-positive (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) or Gram-negative plant bacteria (*Agrobacterium* spp., *Pectobacterium* sp., *Pseudomonas corrugata*, *P. fluorescens*, *P. mediterranea*, *P. tolaasii*, *P. viridiflava*, *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas campestris*).

In what concerns the plant pathogenic fungi, *Alternaria citri*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *C. gloesporioides*, *Penicillium expansum* and *Stemphylium vesicarium*, the antifungal action of EO and extracts was evaluated in solid medium by the disc diffusion method, where 5 µL of the EO and the extracts were added to sterile Whatman paper discs, with the concentration of 1 mg/mL for plates inoculated by a spore suspension and with 2 mg/mL for plates inoculated by mycelial plugs. No inhibition effect was observed against all the tested fungi. Nevertheless, the tests should be pursued using another method which allows the direct contact of the EO and/or extracts with each fungus.

This study tends to confirm the use of EO and plant extracts to combat different pathogenesis and shows the importance of native species of *Lavandula* to obtain antimicrobial compounds and the relevance of its cultivation as a measure to preserve natural resources. In general, essential oils and extracts obtained from aromatic plants tend to have less deleterious side effects to humans and environment than corresponding synthetic drugs and pesticides and some of them could constitute alternatives or complements to these synthetic compounds. The results obtained for selected human pathogens demonstrate the antimicrobial activity of the extracts and EO of Portuguese *Lavandula* species, thus suggesting their possible utilization for therapeutic purposes. Concerning plant pathogens, studies should be pursued by using more accurate and standardized methods.

Índice Geral

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Extended Abstract	IV
Índice de Figuras	VIII
Índice de Quadros	IX
Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas	X
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Plantas Aromáticas e Medicinais no Mundo.....	3
2.2. O género <i>Lavandula</i>	4
2.2.1. Taxonomia	4
2.2.2. Distribuição Geográfica	5
2.2.3. Caracterização Morfológica	6
2.2.3.1. <i>Lavandula stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> Rozeira (Rozeira)	6
2.2.3.2. <i>Lavandula pedunculata</i> (Miller) Cavanille	7
2.2.4. Estruturas secretoras.....	7
2.2.4.1. Óleos essenciais (OE).....	8
2.2.4.2. Algumas aplicações de OE.....	11
2.2.4.3. Efeito dos OE em organismos patogénicos e mecanismos de ação.....	12
3. Material e Métodos	15
3.1. Material vegetal.....	15
3.2. Extração de óleos essenciais	15
3.3. Preparação de extratos.....	15
3.4. Microrganismos selecionados.....	16
3.4.1. Agentes patogénicos humanos	16
3.4.2. Agentes patogénicos de plantas	18
3.5. Preparação de amostras para ensaios de atividade antimicrobiana	21
3.6. Avaliação da atividade antimicrobiana de OE e de extratos.....	21
3.6.1. Método da diluição em meio líquido	22
3.6.2. Método da difusão em meio sólido	23

3.6.2.1. Inoculação por sementeira de esporos.....	23
3.6.2.2. Inoculação por discos de micélio.....	24
4. Resultados e Discussão	25
4.1. Extração de óleos essenciais e extratos.....	25
4.2. Ensaio de atividade antimicrobiana	25
4.2.1. Determinação de CMI das amostras para agentes patogénicos humanos	26
4.2.2. Determinação de CMI das amostras para agentes fitopatogénicos.....	36
4.2.3. Método da difusão em meio sólido com inoculação por sementeira de esporos e por discos de micélio	37
5. Conclusões Gerais e Perspetivas Futuras	39
6. Referências.....	41

Índice de Figuras

Figura 1 - <i>Lavandula stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> Rozeira (A) e <i>L. pedunculata</i> (B).....	5
Figura 2 - Microfotografias de tricomas existentes em <i>Lavandula pedunculata</i> , obtidas por microscopia eletrónica de varrimento: A, célula da cabeça de tricoma peltado; B, tricoma capitado do tipo I; tricoma capitado do tipo II; C, tricoma misto do tipo I (Adaptado de Jorge, 2012).....	8
Figura 3 – Exemplo de resultados CMI de <i>Aspergillus niger</i>	29
Figura 4 - Exemplo de resultados CMI de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
Figura 5 - Exemplo de E-test a <i>Rhodotorula rubra</i> (A) e <i>Tricosporon cutaneum</i> (B) para fluconazol (tira FL) e anfotericina B (tira AP).	30
Figura 6 – Resultados positivos de inibição de microrganismos (CMI < 100 µg/mL) resultantes da utilização de óleo essencial (OE) e extratos de <i>Lavandula stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>	33
Figura 7 - Resultados positivos de inibição de microrganismos (CMI < 100 µg/mL) resultantes da utilização de óleo essencial (OE) e extratos de <i>L. pedunculata</i>	33
Figura 8 - Exemplo de ensaio de inibição de <i>Alternaria citri</i> , pelo método da sementeira de esporos: A - Montagem do ensaio com placa de Petri inoculada com esporos de <i>A. citri</i> e contendo, à esquerda, disco de papel de filtro embebido no extrato a testar e, à direita, disco embebido em água destilada esterilizada; B - Resultado observado, decorridos 7 dias de incubação à temperatura de 25°C, na obscuridade, onde se nota ausência de halo de inibição em torno do disco contendo a amostra.	38
Figura 9 - Resultado do método dos discos para <i>Colletotrichum gloesporioides</i> (esquerda com amostra e direita com controlo negativo).	38

Índice de Quadros

Quadro 1 - Composição percentual dos principais componentes dos óleos essenciais de <i>Lavandula stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i> e de <i>L. pedunculata</i> (adaptado de Feijão, 2011).....	10
Quadro 2 - Agentes patogénicos do Homem selecionados para estudo,	18
Quadro 3 - Agentes fitopatogénicos selecionados para estudo,	19
Quadro 4 - Agentes fitopatogénicos selecionados para estudo,	19
Quadro 5 - Rendimentos dos extratos obtidos nos dois <i>taxa</i>	25
Quadro 6 - Resultados de CMI obtidos com as amostras de <i>Lavandula stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>	26
Quadro 7 - Resultados de CMI obtidos com as amostras de <i>Lavandula pedunculata</i>	28
Quadro 8 - Resultados obtidos nos controlos positivos através de E-test (Epsilometer test)	31
Quadro 9 - Resultados de CMI obtidos com as amostras de <i>L. pedunculata</i>	37

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

AcOEt – Acetato de etilo

ATCC - American Type Culture Collection

ATP – Adenosina Trifosfato

a.C – antes de Cristo

BHI – Brain Heart Infusion

CaCO₃ – Carbonato de Cálcio

CBS - Centraalbureau voor Schimmelcultures

CFBP - Collection Française de Bactéries Phytopathogènes

cfu – Colony-forming units

CH₂Cl₂ –Diclorometano

CIP - Collection de l' Institut Pasteur

cm - centrimetro

CMI – Concentração Mínima Inibitória

DMSO – Dimetilsulfóxido

et al. – e outros

EUA – Estados Unidos da América

ex. - Exemplo

E-test – Epsilometer test

FFUL - Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

g - gramas

GYCA – Glucose, extrato de levedura, carbonato de cálcio precipitado e agar

h - horas

ha – hectares

HIV/SIDA – Vírus da Imunodeficiência Humana

H₂O - Água

L. - Linneu

LISI - Herbário do Instituto Superior de Agronomia

LISU - Herbário da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

LPVVA - Laboratório de Patologia Vegetal “Veríssimo de Almeida”

máx - máximo

MeOH – Metanol

MH –Mueller-Hinton

Mill. - Miller

min – mínimo

mg – miligrama

mL – mililitro
mm - milímetro
m² – metro quadrado
N – Norte
NA – Nutrient Agar
NDA – Nutrient Dextrose Agar
nm - nanómetros
n-hex – *n*-hexano
OE – Óleos Essenciais
PAM – Plantas Aromáticas e Medicinais
PDA - Potato Dextrose Agar
pv. - patovar
sp. – espécie
spp. – espécies
subsp. - subespécie
s.d. – sem dados
var. – variedade
v/p – volume por peso
v* - vestigial
W - Oeste
°C – graus Celsius
µg – micrograma
µL – microlitro

1. Introdução

A bacia mediterrânica é considerada um “hotspot” de biodiversidade a nível mundial (Myers *et al.*, 2000), onde cerca de metade das espécies vegetais existentes são endémicas. Alguns desses endemismos são representados por plantas aromáticas e medicinais (PAM), em que a flora portuguesa é muito rica, estando descritas mais de 500 espécies em Portugal (Figueiredo *et al.*, 2006).

As PAM, embora apresentem um peso relativamente diminuto na economia nacional, quando comparada a outros setores agrícolas, têm vindo a revelar uma dinâmica de crescimento notável, atraindo novos produtores, de perfil essencialmente jovem e diferenciado (GPP, 2013). A importância económica destas plantas é muito elevada, pois constituem uma excelente alternativa em sistemas agrícolas sustentáveis e proporcionam a rentabilização de terrenos marginais para a agricultura (Figueiredo *et al.*, 2006). Constituem ainda uma mais-valia para as regiões onde são cultivadas, pois sendo uma atividade trabalho-intensivo, potenciam a criação de emprego em meio rural (GPP, 2013). Os produtores de PAM (e condimentares) diferenciam-se usualmente pelo destino da produção, que pode ser para consumo em fresco, para secar ou para a obtenção de óleos essenciais (OE). O cultivo de PAM para a obtenção de OE é ainda muito restrito em Portugal, estando registados em cultura ao ar livre 30 ha em modo de produção convencional e 23,71 ha em modo de produção biológico. Por sua vez, em cultura protegida, encontram-se registados 550 m², na sua totalidade em modo de produção biológico (GPP, 2013).

O crescente interesse pelas plantas aromáticas e/ou medicinais prende-se com as propriedades únicas que estas plantas exibem e ainda pelas possibilidades de utilização diversificada, que vai desde a culinária à medicina tradicional e à transformação industrial, para obtenção de OE, utilizados na indústria farmacêutica, de perfumes, cosmética e aditivos. Os OE são conhecidos desde há séculos pelas suas propriedades biológicas e têm sido amplamente avaliados no que respeita à sua ação bactericida, antiviral, fungicida, inseticida e anti-parasítica (Naveed *et al.*, 2013). Estas características tornam as PAM, ou os seus derivados, muito importantes para uso na área médica, contra numerosos agentes patogénicos do Homem, como as bactérias, especialmente aquelas que desenvolveram resistência aos antibióticos (Naveed *et al.*, 2013). Também na área da proteção das culturas, o uso de extratos ou de OE como meio de luta alternativo contra pragas e doenças assume especial relevância, atendendo às crescentes restrições ao uso de pesticidas, bem como ao aumento do número de inimigos resistentes a estes produtos ou a antibióticos (Magro *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2012; Stockwell & Duffy, 2012).

A utilização de PAM, da família *Lamiaceae*, no controlo de pragas e doenças das culturas e no controlo de doenças do Homem é referida por alguns autores (Mulas, 2006;

Britto *et al.*, 2012). Relativamente ao género *Lavandula*, com exceção de *L. angustifolia* (Hussain *et al.*, 2010), a informação é mais restrita e existe alguma controvérsia na literatura sobre a bioatividade dos óleos essenciais produzidos por outras espécies do mesmo género (Cavanagh & Wilkinson, 2002).

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a potencial atividade antibacteriana e antifúngica de extratos vegetais e de óleos essenciais obtidos a partir de duas espécies autóctones de *Lavandula*: *L. stoechas* subsp. *luisieri* Rozeira (Rozeira) e *L. pedunculata* (Miller) Cavanille, relativamente a patógenos do Homem e das plantas.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Plantas Aromáticas e Medicinais no Mundo

Algumas plantas aromáticas e medicinais (PAM) caracterizam-se por possuírem óleos essenciais (OE), localizados em estruturas especializadas que podem ser internas ou externas. Algumas dessas PAM são de uso popular, desde há muitos anos, em costumes adquiridos de geração em geração. Já no Paleolítico o Homem usava as plantas para alimento, construção de abrigos, medicamento, aquecimento, entre outras finalidades (Cunha *et al.*, 2009).

A China e a Índia sempre usaram muito as PAM, pelo que ainda hoje estas duas culturas as empregam com conhecidos resultados. Na Índia, uma das regiões mais ricas em PAM, algumas espécies, como por exemplo o manjerico (*Ocimum minimum* L.), são consideradas sagradas (Cunha *et al.*, 2009).

Os egípcios deram especial atenção aos OE das plantas, utilizando-os para fins curativos, em cosmética e em outros produtos aromáticos. A Rainha Hatshepsut (aproximadamente 1490-1468 a.C), a única mulher faraó, adorava perfumes e incentivou o uso de cosméticos com produtos obtidos de plantas. Nesse tempo, a queima de PAM em templos e o seu uso nos embalsamentos era frequente (Cunha *et al.*, 2009).

Os gregos foram grandes conhecedores e consumidores de produtos odoríferos naturais, tendo publicado diversas obras sobre as suas propriedades e os melhores locais de colheita de PAM. Em Atenas, na luta contra epidemias, queimavam-se *Lavandula* L. spp., alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), hissopo (*Hyssopus officinalis* L.), entre outras plantas. O uso de óleos aplicados em massagens também era frequente. Os romanos aproveitaram o conhecimento dos gregos e começaram a usar PAM, especialmente na perfumaria e nas massagens com óleos aromatizados. A própria palavra *Lavandula* vem do latim “lavare”, devido aos OE destas plantas de aroma agradável serem usadas, na antiguidade, nos banhos dos romanos (Evans, 2009).

Por outro lado, a civilização árabe desenvolveu a técnica de destilação de OE, o que permitiu um aproveitamento mais vantajoso destes compostos. Os portugueses também contribuíram muito para o conhecimento de PAM, introduzindo na Europa algumas plantas da flora de outros continentes. No século XVI, os Jesuítas aprenderam com as populações indígenas do Brasil a fazer muitos medicamentos à base de plantas e difundiram esse saber (Cunha *et al.*, 2009).

Atualmente, um grande número de PAM continua por estudar. A forma alarmante como se processa em algumas regiões do mundo o extermínio da flora espontânea, ainda antes da sua identificação e investigação, justifica a importância destes estudos. No entanto,

e embora durante muitos anos se tenha dado preferência às plantas espontâneas por estarem mais à disposição do Homem, a colheita de espontâneas hoje em dia foi praticamente abandonada, passando-se à cultura intensiva, obtendo-se assim plantas mais uniformes quanto à natureza dos seus constituintes, satisfazendo a procura e evitando a sua extinção (Cunha *et al.*, 2009).

2.2. O género *Lavandula*

2.2.1. Taxonomia

A família Lamiaceae Martinov (sinónimo Labiatae Adanson) (Harley *et al.*, 2004) compreende cerca de 250 géneros de plantas, de entre os quais o género *Lavandula* L. (Morales, 2000). A designação vulgar desta família das labiadas, deriva das flores apresentarem pétalas morfologicamente semelhantes a pequenos “lábios” (Harley *et al.*, 2004).

O género *Lavandula* apresenta uma taxonomia controversa, tendo ao longo dos anos diversos autores considerado diferentes espécies e subespécies. Durante o Renascimento, com a invenção da imprensa, muitos trabalhos foram publicados em *herbals* reconhecendo-se, desde essa época, várias espécies de *Lavandula*, como *L. angustifolia* Mill., *L. latifolia* Medikus, *L. multifida* L., *L. dentata* L. e *L. pedunculata* (Mill.) Cavanille. Na nomenclatura botânica, com a publicação em 1753, da obra *Species Plantarum*, Linnaeus difundiu e alargou as designações binomiais de algumas espécies: *L. dentata* L., *L. stoechas* L., *L. spica* L. e *L. multifida* L.. Além destes, Miller atribuiu os primeiros nomes binomiais para *L. canariensis* Mill., *L. angustifolia* Mill. e *Stoechas pedunculata* Mill. (*L. pedunculata*) (Upson & Andrews, 2004).

A primeira monografia sobre o género *Lavandula*, *De Lavandula*, foi publicada em 1780 por Lundmark e reconhecia seis espécies (Upson & Andrews, 2004). Para Portugal, Pereira Coutinho (1939) considera seis espécies: *L. multifida* L., *L. spica* L., *L. dentata* L., *L. viridis* Willderson, *L. stoechas* L. e *L. pedunculata* L.. Amaral Franco (1984) indica cinco espécies em Portugal, estando *L. stoechas* e as suas categorias infraespecíficas distribuídas por dois *taxa* distintos, *L. luisieri* e *L. pedunculata*. A obra mais recente, *Flora Iberica* (Morales, 2010), descreve o género *Lavandula* da Península Ibérica referindo oito espécies: *L. angustifolia* Mill. (subsp. *pyrenaica* (DC) Guinea), *L. latifolia* Medikus, *L. lanata* Boissier, *L. stoechas* L. (subsp. *stoechas* L. e subsp. *luisieri* Rozeira (Rozeira)), *L. pedunculata* L., *L. viridis* L'Héritier, *L. dentata* L. e *L. multifida* L. Deste modo, verifica-se que Morales mantém a espécie *L. stoechas*, mas com duas subespécies (*L. stoechas* subsp. *stoechas* e *L.*

stoechas subsp. *luisieri*). De acordo com este autor a designação de *L. luisieri*, ainda adotada em muitos trabalhos, é atualmente *L. stoechas* subsp. *luisieri*.

2.2.2. Distribuição Geográfica

Existem 39 espécies de *Lavandula* com distribuição geográfica por várias zonas do globo, ocorrendo principalmente em toda a bacia mediterrânica, península Arábica e Sul da Ásia até à Índia, incluindo ainda as ilhas da Macaronésia. As PAM, compreendendo o género *Lavandula*, são características de climas temperados, suportando a seca no Verão (Morales, 2010).

Em Portugal, existem duas espécies auutóctones, popularmente conhecidas como alfazema ou rosmaninho, sendo difícil a sua diferenciação. Uma delas é atualmente designada por *L. stoechas* subsp. *luisieri* Rozeira (Rozeira) (Figura 1A), cresce na zona Centro e Sul de Portugal, nas regiões da Beira Litoral, Ribatejo, Estremadura, Alto e Baixo Alentejo, bem como no Algarve. Aparece em bosques densos de carvalho, pinheiro ou sobreiro, com substratos arenosos, compostos por quartzo, granito ou ardósia, raramente calcários (Morales, 2010). É tolerante a solos ácidos mas pouco tolerante ao frio (Botelho, 2005). Esta espécie é referenciada com estatuto de conservação de “pouco preocupante” (*Least Concerning*), uma vez que é pioneira em áreas ardidas, reproduzindo-se rapidamente, sobretudo por semente (Upson & Andrews, 2004).



Figura 1 - *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* Rozeira (A) e *L. pedunculata* (B)
(Fonte: G.Teixeira)

A outra espécie é *L. pedunculata* (Miller) Cavanille (Figura 1B), que pode ser encontrada por todo o país, nas regiões do Minho e Trás-os-Montes (Alto Douro), Douro Litoral, Beira Alta e Beira Baixa, Beira Litoral, Estremadura, Alto e Baixo Alentejo e Algarve. Aparece em pastagens, terrenos baldios ou cultivados, junto a tomilhos, amoreiras silvestres, zimbro, carvalhos, castanheiros e sobreiros. Prefere substratos ácidos e arenosos (Morales, 2010).

2.2.3. Caracterização Morfológica

As flores das plantas do género *Lavandula* são pequenas, encontrando-se reunidas em inflorescências espiciformes terminais derivadas de uma série de ramos cimosos, frequentemente axilares. São flores hermafroditas, bilabiadas e zigomórficas. O cálice é simsépalo, tubuloso e pode ser regular ou bilabiado, sendo que o lábio superior possui dois lóbulos e o inferior três, com tamanho igual, ou com lábio superior maior ou modificado. A corola é simpétala, tubulosa, tendo cerca de três vezes o comprimento do cálice, é bilabiada, possuindo o lábio superior dois lóbulos e o inferior três lóbulos menores. O androceu (anteras e filete) é formado por quatro estames declinados, curvados para baixo e geralmente didinâmicos (dois pares de estames de diferente comprimento). O gineceu (estigma, filete e ovário) é composto por um único estigma, o ovário é súpero, bicarpelar e bilocular, com dois óvulos em cada lóculo, existindo uma constrição em cada lóculo, por falso septo, dando impressão de tetralocular. Na base de cada flor encontram-se brácteas foliáceas, denominadas folhas ou brácteas florais férteis (Upson, 2002).

2.2.3.1. *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* Rozeira (Rozeira)

Lavandula stoechas subsp. *luisieri* apresenta-se como sub-arbusto lenhoso, tomentoso e aromático até 50 cm. As folhas são de coloração verde acinzentada-tomentosa, as distais apresentam-se oblongas a lanceoladas, planas ou de margens mais ou menos onduladas. As folhas dos ramos estéreis são menores, mais estreitas e de margens bem definidas com um pedúnculo com cerca de 0-30 mm. A espiga cilíndrica e por vezes ovoide mede cerca de 15-50 x 8-15 mm, é pedunculada (5-15 mm), de brácteas férteis cordadoreniformes, com nervuras proeminentes, bem reticuladas e tomentosas, e de brácteas distais estéreis (8-30 mm) oblanceoladas, geralmente púrpuras ou lilacíneas, raramente brancas. O cálice tomentoso mede cerca de 3-5 mm e a corola 6-8 mm com coloração púrpura-anegrada (Franco, 1984; Morales, 2010).

2.2.3.2. *Lavandula pedunculata* (Miller) Cavanille

Lavandula pedunculata apresenta-se sob a forma de sub-arbusto lenhoso, tomentoso, podendo atingir até 70 cm. As suas folhas têm uma coloração acinzentada-tomentosa ou verde-acinzentada-tomentosa, são inteiras e de margens onduladas. As folhas distais dos ramos férteis são lineares a oblongo-oblancheoladas, enquanto as dos ramos estéreis são menores e mais estreitas. As flores inserem-se em inflorescências tipo espiga, com forma ovóide ou subcilíndrica, medindo 10-35 x 8-17 mm, com pedúnculo com 5-24 cm. As brácteas férteis, obtriangulares, têm 4-7 x 4-6 mm e revelam nervuras pouco proeminentes, longitudinais e paralelas. As brácteas estéreis têm 12-30 mm e vão de oblongas a lanceoladas, tendo coloração violácea a pálido-lilacínea ou branca (raramente). O cálice mede cerca de 4-7 mm e a corola 6-8 mm, com coloração púrpura-anegrada (Franco, 1984; Morales, 2010).

2.2.4. Estruturas secretoras

As espécies incluídas na família Lamiaceae possuem estruturas secretoras, os tricomas secretores ou glandulares, responsáveis pela secreção de diferentes compostos, designadamente OE. Possuem ainda tricomas não secretores ou não glandulares com funções associadas à defesa da planta, sendo por isso denominados por tricomas protetores ou tectores. Estes podem ser uni- ou pluricelulares, unisseriados e/ou estrelados, com um número variável de braços (Feijão, 2011).

Os tricomas secretores ou glandulares podem ser de dois tipos, peltados ou capitados, sendo que ambos apresentam uma cabeça secretora, um pescoço ou pedúnculo e uma base ou pé (Moreira *et al.*, 2010). Segundo estes autores, nos tricomas peltados a célula da cabeça divide-se sucessivamente de modo radial, originando normalmente entre quatro a doze células, consoante a espécie, ficando todas cobertas por uma cutícula comum (Figura 2A). Os OE acumulam-se no espaço sub-cuticular, entre a cutícula e a parede celular. Os tricomas capitados são mais diversificados e de acordo com Werker *et al.* (1985) podem pertencer aos seguintes tipos:

- Tipo I – Apresenta uma célula basal, uma a duas células pedunculares e uma cabeça com uma ou duas células (Figura 2B). Os materiais secretados são expelidos por poros existentes na cutícula;
- Tipo II – Normalmente digitiforme, apresenta uma célula basal cónica, um pedúnculo com uma ou duas células e uma cabeça alongada ou redonda (Figura 2C). Os materiais secretados são libertados através de uma rutura na cutícula;

- Tipo III – Pode apresentar um pedúnculo com duas a cinco células e uma cabeça circular, que pode colapsar, tomando a forma de uma taça. Os materiais secretados podem ser expelidos por ruptura da cutícula ou permanecer intactos no tricoma.

Feijão (2011) refere ainda em *L. pedunculata*, a presença de outro tipo de tricomas, que combinam características dos tricomas tectores estrelados com os tricomas capitados tipo II, pelo que se denominam tricomas mistos. Estes podem apresentar um pedúnculo pluricelular que suporta dois a três braços, onde apenas um tem cabeça secretora (tricoma misto tipo I – Figura 2D), ou podem apresentar um pedúnculo pluricelular com dois braços, ambos com cabeça secretora (tricoma misto tipo II).

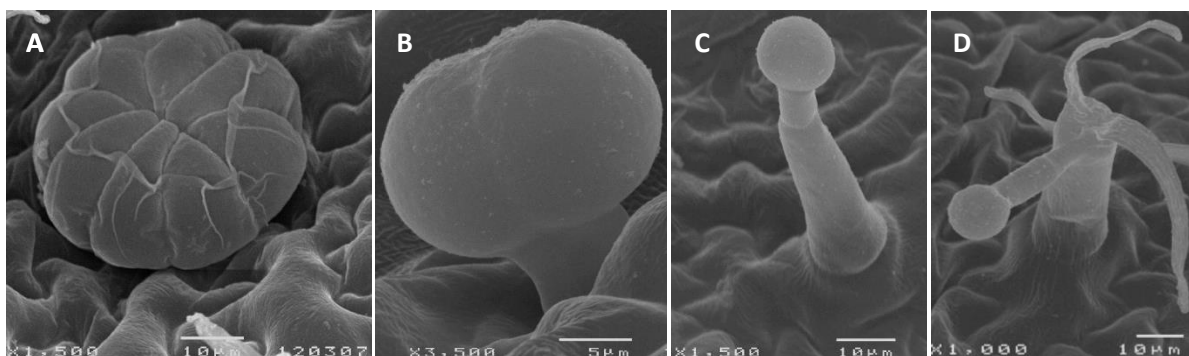


Figura 2 - Microfotografias de tricomas existentes em *Lavandula pedunculata*, obtidas por microscopia eletrônica de varrimento: A, célula da cabeça de tricoma peltado; B, tricoma capitado do tipo I; tricoma capitado do tipo II; C, tricoma misto do tipo I (Adaptado de Jorge, 2012).

2.2.4.1. Óleos essenciais (OE)

Os OE são compostos muito comuns nas labiadas. Estes são misturas complexas de compostos voláteis onde predominam monoterpenos e sesquiterpenos. São insolúveis em água mas solúveis em solventes orgânicos apolares e gorduras, apresentando-se normalmente incolores ou amarelados (Prins *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2009). Conforme anteriormente referido, nas plantas labiadas os OE acumulam-se em estruturas epidérmicas secretoras especializadas, tricomas secretores ou glandulares de vários tipos, inseridos nos diferentes órgãos aéreos da planta (Moreira *et al.*, 2010).

Os OE são sintetizados por estas plantas como metabolitos secundários. Pensa-se que estes metabolitos não sejam necessários ao crescimento e desenvolvimento das plantas mas são acumulados devido à função ecológica de comunicação e defesa, em

resposta a condições de stresse, a ataques de agentes patogénicos e de herbívoros e ainda para atracção de insetos polinizadores (Trapp & Croteau, 2001).

As condições do solo, o clima, a altitude, a época de colheita da planta e o órgão colhido, são também fatores que condicionam a quantidade, qualidade e composição química dos OE, em geral (Delgado, 2010). Segundo Gonzalez-Coloma *et al.* (2011), amostras secas de *L. stoechas* subsp. *luisieri* contêm um maior número de componentes na sua composição, comparativamente às amostras frescas, variando também a sua concentração. Isto atribui-se à maior volatilidade dos compostos no estado fesco, tendo sido detetada ainda uma perda de concentração de certos componentes, como acetato de necrodilo e um aumento de outros, como lineol e fenchona. Também o estado fenológico das plantas pode influenciar a composição química dos OE. Esta pode variar significativamente nos períodos de intensa atividade metabólica, como a floração (Cunha, 2005). Uma outra função muito importante dos OE é ajudarem na economia hídrica das plantas, por um lado contribuindo na regulação da evapotranspiração, saturando o ambiente envolvente dos estomas e, por outro, aumentando o brilho da superfície foliar que por reflexão das radiações proporciona regulação da temperatura da planta (Cunha, 2005).

Existem vários métodos de extração de OE, sendo a hidrodestilação o mais comum. Neste método, a extração dos compostos voláteis é realizada por arrastamento de vapor de água, seguida de passagem de vapor a líquido por um condensador apropriado. Por fim, a ação da gravidade separa a fase aquosa do OE. O destilado obtido é assim constituído por OE e água aromatizada, o hidrolado (Cunha *et al.*, 2009).

No género *Lavandula*, a espécie *Lavandula angustifolia* é aquela cujo OE é mais estudado e usado farmacologicamente. O seu OE é composto principalmente por linalol (30-40%) e acetato de linalilo (36-58%), e em quantidades menores por β -cariofileno (2,6-6,3%), monoterpenos não oxigenenados e monoterpenos oxigenados (Cunha *et al.*, 2009)

Na família das labiadas é frequente encontrar plantas da mesma espécie com uma diferente composição química, sobretudo em OE, designadas por variedades químicas ou quimiotipos (Torras *et al.*, 2007). Essas variações químicas, intraespecíficas, não são resultado apenas da presença ou ausência de um composto químico, mas estão associadas a determinados fatores que podem influenciar a sua síntese e acumulação, tais como diferente distribuição geográfica, condições ambientais, variações fisiológicas, fatores genéticos e evolutivos (Figueiredo *et al.*, 2008). É importante referir que uma composição química diferente pode pressupor propriedades bioativas distintas (Torras *et al.*, 2007).

Garcia-Vallejo *et al.* (1990), estudaram os OE de *L. stoechas* subsp. *luisieri* de populações do Sul de Espanha e verificaram a presença de um quimiotipo 1,8-cineol/esteres. Garcia-Vallejo *et al.* (1994) efetuaram outra caracterização quimio-taxonomica da mesma espécie no Sul de Espanha e detetaram pela primeira vez, nos OE,

um novo grupo de terpenos ciclopenténicos derivados do necrodano, únicos no reino vegetal, o que diferencia completamente esta espécie das restantes do género *Lavandula*.

Por sua vez, Delgado (2010), ao estudar populações da Beira Interior de Portugal, observou que a composição dos OE obtidos a partir de diferentes partes das plantas era diferente, predominando o acetato de trans- α -necrodilo e a cânfora nas inflorescências e o acetato de trans- α -necrodilo e o 1,8-cineol, nas folhas, sendo que em ambos os casos o composto maioritário era o acetato de trans- α -necrodilo. Assim sendo, Delgado (2010) verificou que as populações da Beira Interior se comportavam como populações quimicamente distintas de algumas populações do Sul de Espanha.

Zuazarte *et al.* (2009) estudaram os OE de *L. pedunculata* existente no Norte e Centro de Portugal e concluíram que os seus componentes maioritários eram os monoterpenos oxigenados (69 – 89%), os monoterpenos hidrocarbonados (4,5-22,5%), a fenchona (1,3 – 59,7%), o 1,8-cineol (2,4-55,5%) e a cânfora (3,6 – 48%). No entanto, algumas populações oriundas de Coimbra e de parte da região da Guarda apresentaram uma maior percentagem de fenchona, ao contrário de outras populações originárias de Mirandela, Bragança e de parte da região da Guarda que revelaram maior riqueza em 1,8-cineol, o que revela mais uma vez a variabilidade química dos OE desta espécie.

Feijão (2011) identificou os componentes dos OE das mesmas espécies e populações utilizadas no presente estudo, através da técnica de Cromatografia Gás-Líquido e Espectrometria de Massa e concluiu que os constituintes maioritários eram o acetato de trans- α -necrodilo para *L. stoechas* subsp. *luisieri* e fenchona para *L. pedunculata*. Em ambas as espécies o constituinte 1,8-cineol foi o segundo mais concentrado (Quadro 1).

Quadro 1 - Composição percentual dos principais componentes dos óleos essenciais de *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* e de *L. pedunculata* (adaptado de Feijão, 2011)

Espécie	Constituintes maioritários ($\geq 5\%$)	Min (%)	Máx (%)
<i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>	Acetato de trans- α -necrodilo	3,9	19,9
	1,8-cineol	0,6	17,4
	5-metileno-2,3,4,4-tetrametilciclopent-2-enona	2,2	12,6
	Limoneno	0,2	8,7
	NID	2,5	8,4
	Acetato de lavandulol	5,2	7,2
	3.5-dimetilo-1.4.4-trimetilciclopenteno	3,9	7,3
	Cânfora	v*	6,2
	Pulegona	v*	5,7
	Viridiflorol	1,4	5,8
	Trans- α -necrodol	0,8	5,4
<i>L. pedunculata</i>	Fenchona	62,4	70,1
	1.8-cineol	6,7	28,1
	Cânfora	3,6	5

v* – vestigial

2.2.4.2. Algumas aplicações de OE

Um elevado número de compostos têm capacidade de alterar a fisiologia e o comportamento de pragas e agentes patogénicos das plantas, podendo ser usados como biopesticidas. Foram registadas diversas atividades biológicas em produtos vegetais, como toxicidade, propriedades de regulação do crescimento e ação repelente e/ou fago-inibidora (Chiam *et al.*, 1999; Huang & Ho, 1998). Diversos estudos têm sido realizados a fim de testarem possibilidades de utilização de OE no controlo de pragas e doenças de diversas plantas e produtos armazenados (Owusu, 2000; Bekele & Hasanali, 2001; Villalobos & Ballesta, 2003; Koul *et al.*, 2008). Dos compostos já estudados, os terpenóides têm sido os que mais interesse suscitam, tendo evidenciado elevados efeitos de toxicidade, mortalidade larvar, inibição de crescimento, ação repelente e fago-inibição nos insetos (González-Coloma *et al.*, 1995, 1996, 2005; Gutierrez *et al.*, 1997).

Derivados do necrodano foram descobertos na secreção defensiva, produzida por um coleóptero, *Necrodes surinamensis*, originário da América Central e do Norte, ejetada sempre que o inseto se encontrava perante outros insetos como formigas, moscas e baratas (Eisner & Meinwald, 1982; Eisner *et al.*, 1986; Roach *et al.*, 1990). Estes autores evidenciaram que os referidos compostos possuíam uma ação repelente e irritante para insetos. Deste modo, pensa-se que na própria planta estes compostos também terão um papel de defesa contra pragas.

Delgado (2010) estudou os efeitos defensivos de *L. stoechas* subsp. *luisieri* contra larvas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) e adultos de *Myzus persicae* e *Rhopalosiphum padi* (Homemiptera: Aphididae) e concluiu que a planta tem capacidades repelentes e ação fago-inibidora, tal como González-Coloma *et al.* (2006) haviam referenciado. Esta espécie ficou reconhecida como tendo uma aptidão especial para ser utilizada como biopesticida.

Cavanagh & Wilkinson (2002) referem que os OE de várias espécies de *Lavandula* possuem, no geral, efeito sedativo, relaxante anti-depressivo, anti-fúngico e anti-bacteriano. Estes autores demonstraram ainda que podem ocorrer efeitos secundários, quando os OE são utilizados em elevadas concentrações. Na área agronómica, Riotte (1999) refere que pulverizações na cultura do algodão com extratos da parte aérea de *Lavandula* a 2% mata em 24 horas 50-80% das pragas desta cultura.

Soylu *et al.* (2010) estudaram as atividades antifúngicas de óleos essenciais de *Origanum syriacum* L. var. *bevanii* (Holmes), *Lavandula stoechas* L. e *Rosmarinus officinalis* L. contra *Botrytis cinerea* (podridão cinzenta) no tomate. Os estudos foram feitos por contacto direto ou por volatilização dos OE com o fungo, analisando-se o crescimento de hifas, a germinação de esporos e o alongamento do tubo germinativo. Aqueles autores concluíram que todos os OE inibiram o crescimento do agente patogénico, dependendo da

concentração utilizada, sendo *O. syriacum* L. var. *bevanii* o mais eficaz, seguido de *L. stoechas* e por fim *R. officinalis*. Concluíram também que a volatilização dos OE causa maior inibição do que o efeito por contato e que, no primeiro caso, os tratamentos curativos são mais eficazes do que os preventivos. Por sua vez, Angioni *et al.* (2006) estudaram a atividade antifúngica de OE obtido de folhas e flores, separadamente, de *L. stoechas* contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Aspegillus flavus* e observaram atividade em ambos os OE, sendo o das folhas mais ativo.

Relativamente a agentes patogénicos do Homem, Zuzuarte *et al.* (2011) estudaram os OE de *L. viridis* e observaram uma ação antifúngica contra *Cryptococcus neoformans*, várias estirpes de *Candida*, *Aspergillus* e fungos dermatófitos. Relativamente a bactérias, Baldovini *et al.* (2005) trabalharam apenas com OE de *L. stoechas* subsp. *luisieri*, observando atividade contra as bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *S. pyogenes*. Também Teixeira *et al.* (2012) verificaram que os extratos de *L. stoechas* subsp. *luisieri* e *L. peduncula* apresentavam atividade antimicrobiana em relação a estirpes de *S. aureus* e ainda relativamente a bactérias Gram-negativas.

2.2.4.3. Efeito dos OE em organismos patogénicos e mecanismos de ação

Os OE e os seus componentes usam uma variedade de alvos para atuarem, em bactérias, designadamente a parede celular, a membrana citoplásmica e o citoplasma, podendo em certas condições alterar completamente a morfologia da célula. Devido à estrutura da parede celular, as bactérias Gram-negativas são em geral mais resistentes aos OE do que as bactérias Gram-positivas, como explicado por Cabeen & Jacobs-Wagner (2005).

A parede celular de bactérias Gram-positivas é constituída principalmente por peptidoglicano, ou mureína (90%–95%), ao qual se ligam outras moléculas tais como ácidos teicóicos e proteínas, o que possibilita que moléculas hidrofóbicas penetrem as células e atuem quer a nível da parede quer do citoplasma. Por sua vez, a parede celular de bactérias Gram-negativas é mais complexa. Possui uma camada fina de peptidoglicano (20%) e uma membrana exterior firmemente ligada à camada de peptidoglicano por lipoproteínas que estabelecem ligações covalentes com o peptidoglicano. A presença desta membrana exterior é uma das principais características que distingue a parede de bactérias Gram-negativas da de Gram-positivas. A membrana exterior, por sua vez, é composta por uma camada dupla de fosfolípidos que se ligam à membrana interior por lipopolissacáridos, conferindo-lhe carga negativa e que, no seu conjunto, tornam a parede muito mais resistente à ação de OE e de outros compostos, incluindo antibióticos (Nazzaro *et al.*, 2013).

As bactérias Gram-negativas possuem porinas, que são proteínas transmembranares que permitem a passagem de solutos hidrofílicos para o espaço periplasmático e, em seguida, para o interior da célula bacteriana, mas oferecem resistência à passagem de compostos hidrofóbicos, como são o caso de muitos antibióticos e dos OE, tornando o processo muito mais lento. É esta a principal razão da maior resistência de bactérias Gram-negativas à ação antimicrobiana de OE e até de antibióticos do que de Gram-positivas (em geral).

O mecanismo de ação dos OE depende da composição química dos mesmos e a atividade antimicrobiana não é atribuível a um único mecanismo, mas sim a uma cascata de reações envolvendo toda a célula bacteriana e que resultará na inibição do crescimento das populações bacterianas e também da produção de metabolitos tóxicos. Alguns dos mecanismos descritos por Nazzaro *et al.* (2013) incluem:

- Degradação da parede celular;
- Danos na membrana citoplasmática;
- Coagulação do citoplasma;
- Desnaturação de proteínas;
- Danos nas proteínas da membrana, levando a um aumento da permeabilidade da mesma e à perda de metabolitos e iões;
- Alteração da bomba de prótons, reduzindo o ATP intracelular;
- Inibição da comunicação célula a célula e da ativação de genes “quorum sensing”, essenciais para a expressão de virulência, esporulação, formação de biofilmes, entre outras;
- Lise e morte celular.

Relativamente a fungos, os mecanismos de ação dos OE são muito menos conhecidos. Recentemente, Chen *et al.* (2014) verificaram que OE extraído de sementes de *Anethum graveolens* L. atuava a nível da membrana citoplasmática e mitocôndrias de *Candida albicans*. Neste estudo, a disfunção mitocondrial conduziu à acumulação de espécies reativas de oxigénio na célula, com o consequente choque oxidativo, seguido de morte celular. Num estudo anterior, OE extraído da mesma planta originaram em *Aspergillus flavus* inibição da biossíntese do ergosterol, um lípido estrutural que integra a membrana celular de todos os fungos, tal como acumulação de espécies reativas de oxigénio (Tian *et al.*, 2012), através da atuação do OE a nível da membrana citoplasmática e das mitocôndrias.

Ainda em relação a *C. albicans*, Stringaro *et al.* (2014) estudaram o OE extraído de *Mentha suaveolens* e verificaram uma diminuição acentuada da aderência das células e da sua atividade metabólica levando à redução (70-80%) da formação de biofilmes. O OE foi

ainda responsável pela inibição da síntese de materiais da parede celular, vacuolização do citoplasma e diminuição da taxa de crescimento celular. Foram igualmente observados danos na camada lipídica da membrana celular.

3. Material e Métodos

3.1. Material vegetal

As colheitas de material das duas espécies de *Lavandula*, *L. pedunculata* e *L. stoechas* subsp. *luisieri*, foram realizadas em 2010, durante o período de floração e envolveram apenas a parte aérea das plantas, caules, folhas e flores.

A espécie *Lavandula pedunculata* foi colhida na Mata Nacional de Escaroupim (Salvaterra-de-Magos) (39° 03' N - 8° 44' W) e *L. stoechas* subsp. *luisieri* na Herdade Ribeira-Abaixo (38° 8' N - 8° 33' W), situada na orla nascente da Serra de Grândola, Baixo Alentejo. Esta Herdade constitui uma Estação de Campo institucionalmente associada ao Centro de Biologia Ambiental, unidade de Investigação e Desenvolvimento que se encontra sediada na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Foram ainda colhidas amostras das duas espécies para herborização e os respetivos “vouchers” foram depositados no Herbário do Instituto Superior de Agronomia (LISI, 164/2011) e no Herbário da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (LISU, 236672).

Todo o material foi seco ao ar, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente e assim permaneceu até à sua utilização.

3.2. Extração de óleos essenciais

O material vegetal seco já moído (165,5 g de *L. stoechas* subsp. *luisieri* e 236,8 g de *L. pedunculata*) foi destilado pelo método da hidrodestilação, durante 3 h, num aparelho do tipo Clevenger de acordo com a Farmacopeia Europeia (Council of Europe, 2007). As amostras de OE obtidas foram armazenadas a -20 °C, até posterior utilização.

3.3. Preparação de extratos

Os diferentes extratos foram obtidos a partir de material vegetal pulverizado, 105 g de *L. stoechas* subsp. *luisieri* e 95 g de *L. pedunculata*, extraídos sequencialmente com o sistema de solventes de polaridade crescente: *n*-hexano (*n*-hex) (750 mL e 800 mL, para cada planta), diclorometano (CH₂Cl₂), acetato de etilo (AcOEt), metanol (MeOH) e água (H₂O) (500 mL e 600 mL, para ambas as plantas), por períodos de 24 h, para cada solvente, à temperatura ambiente. Após esse período, os extratos foram decantados e filtrados para remoção de impurezas, e evaporados em evaporador rotativo (Rotavapor Buchi), sob

pressão reduzida. As amostras dos extratos obtidos foram armazenadas a -20°C, até posterior utilização.

3.4. Microrganismos selecionados

A atividade antimicrobiana de OE e de extratos de *L. stoechas* subsp. *luisieri* e de *L. pedunculata* foi avaliada em dois grupos distintos de microrganismos: agentes patogénicos do Homem e das Plantas.

3.4.1. Agentes patogénicos humanos

A seleção de agentes patogénicos humanos incluídos no painel de testes foi feita com base no modelo proposto por Cos *et al.* (2006a, 2006b). No Quadro 2 apresenta-se o conjunto de microrganismos de referência usados no presente estudo, onde se incluem bactérias, leveduras e fungos causadores de doenças oportunistas no Homem e ainda *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae*. Estes microrganismos pertencem à coleção existente na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, onde são mantidos a -70 °C em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion), pelo que foram repicados para o meio de cultura de Mueller-Hinton (MH) no caso das bactérias e para Sabouraud no caso dos fungos, para revitalização.

Dentre os critérios que presidiram à seleção de algumas espécies/estirpes, salientam-se as seguintes:

- *Enterococcus faecalis* habita o trato gastrointestinal do Homem e animais; é isolada do solo, águas superficiais e matérias primas vegetais e animais, responsável por infeções hospitalares, é multirresistente a antibióticos, pelo que é importante descobrir-se novas formas de as combater (Johnston & Jaykus, 2004);
- *Staphylococcus aureus*, selecionada pela sua capacidade de criar resistência a antibióticos, com facilidade e rapidez, sendo que a estirpe ATCC 6538 é ainda sensível a antibióticos, ao contrário da ATCC 106760 que é resistente aos antibióticos mais usados, metilina e vancomicina;
- *Staphylococcus epidermidis* tem uma elevada especificidade para o Homem, colonizador da pele e responsável por importantes infeções hospitalares; estirpes desta espécie desenvolveram resistência à metilina e a muitos outros antibióticos (Otto, 2009);
- *Escherichia coli* é responsável por infeções urinárias e gastrointestinais e está associada a casos de meningite, peritonite e septicemia, algumas letais; a

resistência a antibióticos tem vindo a aumentar nas últimas décadas (Tadesse *et al.*, 2012);

- *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria ubíqua que afeta uma vasta gama de hospedeiros, desde amibas, a plantas, ao Homem, sobretudo indivíduos com o sistema imunitário deprimido por cancro, fibrose quística e HIV/SIDA, estando ainda associada a infeções pulmonares, urinárias e sistémicas e a infeções hospitalares (He *et al.*, 2004); caracteriza-se pela sua capacidade de desenvolver fenótipos multirresistentes (Lister *et al.*, 2009);
- *Mycobacterium smegmatis* é um bacilo ácido-álcool resistente saprófita, embora seja usada como modelo de crescimento rápido para avaliação preliminar de *M. tuberculosis* (Cowan & Talaro, 2009);
- *Aspergillus niger* é um fungo filamentoso cosmopolita que ocorre em numerosos substratos, incluindo alimentos e órgãos de plantas em fase de decomposição (frutos, sementes e vegetais); é um importante alergénio do Homem, pode estar associado à aspergilose pulmonar, produz micotoxinas potencialmente carcinogénicas e nefrogénicas (Gautman *et al.*, 2011);
- *Candida albicans* e outras *Candida* spp. constituem a causa mais frequente de infeções fúngicas no Homem, estando associadas a infeções nas mucosas, especialmente relevantes em indivíduos imunodeprimidos (Achkar & Fries, 2010; Endo *et al.*, 2010);
- *Cryptococcus neoformans* é um fungo patogénico que afeta essencialmente indivíduos com o sistema imunitário comprometido; infecta o sistema nervoso central causando meningite, meningoencefalite e encefalite (Hull & Heitman, 2002);
- *Rhodotorula rubra*, anterior designação de *Rhodotorula mucilaginosa*, ubíqua em ambientes terrestre e aquático, incluindo marinho, é frequentemente isolado do Homem; associado a sepsis, infeção de cateteres, peritonite, meningite principalmente em doentes com o sistema imunitário comprometido; produz ainda substâncias alergénicas (Wirth & Goldani, 2012);
- *Saccharomyces cerevisiae* é o organismo eucariota melhor caracterizado, com genoma conhecido, de fácil manutenção em laboratório e, por isso, utilizado como modelo em numerosos estudos; é também único pela vasta aplicação industrial, incluindo a produção de alimentos e bebidas fermentadas (ex., pão e cerveja), bioetanol, vacinas e proteínas de uso terapêutico (Otero *et al.*, 2013).

Quadro 2 - Agentes patogénicos do Homem selecionados para estudo, pertencentes à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Microrganismo/Nome científico	Estirpe de referência
Bactéria Gram-positiva	
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC ¹ 6633
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541
<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP ² 104676, CIP 106996
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 9144, ATCC 6538, ATCC 43300, ATCC 25923, CIP 106366, CIP 106414, ATCC 106760
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
Bactéria Gram-negativa	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11105
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
Álcool-ácido resistente	
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 607
Fungo Ascomycota	
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028
<i>Candida dubliniensis</i>	FFUL 21
<i>Candida glabrata</i>	FFUL 12B
<i>Candida guilliermondii</i>	FFUL 1403
<i>Candida kruzei</i>	CFBP ³ 6258
<i>Candida parapsilosis</i>	CFBP 90018
<i>Candida tropicalis</i>	CFBP 750
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FFUL ⁴ 1997
Fungo Basidiomycota	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	FFUL 948
<i>Rhodotorula rubra</i>	FFUL 190
<i>Trichosporon cutaneum</i>	FFUL 18H

¹ ATCC, American Type Culture Collection, Maryland, EUA; ² CIP, Collection de l'Institut Pasteur, Paris, França;

³ CFBP, Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, INRA, Angers, França; ⁴ FFUL, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

3.4.2. Agentes patogénicos de plantas

No Quadro 3 refere-se a coleção de microrganismos (bactérias e fungos filamentosos) fitopatogénicos, ou isolados do solo, usada no presente estudo e pertencente ao Instituto Superior de Agronomia (Laboratório de Patologia Vegetal “Veríssimo de Almeida”), Universidade de Lisboa.

**Quadro 3 - Agentes fitopatogénicos selecionados para estudo,
pertencentes ao Instituto Superior de Agronomia**

Microrganismo / Nome Científico	Isolado	Hospedeiro, local e data de isolamento
Bactéria Gram-Negativa		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> biovar 1	AG 12	<i>Vitis vinifera</i> , Peso da Régua, 1995
<i>Agrobacterium</i> sp.	LPVVA ¹ 2	<i>Vitis vinifera</i> , s.d.
<i>Pseudomonas corrugata</i> type strain	CFBP ² 2431	<i>Lycopersicon esculentum</i> , Reino Unido, 1972
<i>Pectobacterium</i> sp.	CFBP 5658	<i>Zantedeschia aethiopica</i> , França, 1983
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar 6	CFBP 5756	Solo, Bouche-du-Rhône Chateaufrenard (França), 1994
<i>Pseudomonas mediterranea</i> type strain	CFBP 5447	<i>Lycopersicon esculentum</i> , Sicília (Itália), 1994
<i>Pseudomonas tolaasii</i> type strain	CFBP 2068	<i>Agaricus bisporus</i> , Reino Unido, 1982
<i>Pseudomonas viridiflava</i> type strain	CFBP 2107	<i>Phaseolus</i> sp., Suíça, 1927
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i>	LPVVA Amostra 1	<i>Brassica oleracea</i> , Portugal, 2007
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	LPVVA-Amostra 3	<i>Brassica oleracea</i> , Portugal, 2007
Fungo Ascomycota		
<i>Alternaria citri</i>	CBS ³ 107.27	<i>Citrus limonium</i> , Califórnia, 1927
<i>Botrytis cinérea</i>	Rj – Bc	<i>Fragaria x ananassa</i> , Lisboa, 2014
<i>Colletotrichum acutatum</i>	CA 397	<i>Fragaria x ananassa</i> , EUA, s.d.
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	CG 254	<i>Fragaria x ananassa</i> , Canadá, s.d.
<i>Penicillium expansum</i>	CBS 325.48	<i>Malus sylvestris</i> , Estados Unidos da América, 1948
<i>Stemphylium vesicarium</i>	CBS 715.68	<i>Pisum sativum</i> , Canadá, 1968

¹ LPVVA, Laboratório de Patologia Vegetal “Veríssimo de Almeida”, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal; ² CFBP, Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, INRA, Angers, França; ³ CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda

Para completar a coleção de bactérias fitopatogénicas, utilizou-se ainda um outro conjunto de isolados e/ou estirpes de referência pertencente ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, referenciados no Quadro 4.

**Quadro 4 - Agentes fitopatogénicos selecionados para estudo,
pertencentes ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária**

Microrganismo / Nome Científico	Isolado	Hospedeiro, local e data de isolamento
Bactéria Gram-Positiva		
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	1455	Tomateiro, 2013
Bactéria Gram-Negativa		
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	1324	Batateira (tubérculo), 2011
<i>Ralstonia solanacearum</i>	932	Batateira (tubérculo), 2000
	1345	2011
	1346	2011
	1361	Água superficial, 2013
	1458	Batateira (tubérculo), 2013
	1462	Água superficial, 2013

As culturas bacterianas encontravam-se conservadas em meio de cultura GYCA (glucose, 5g; extrato de levedura (Difco), 5 g, CaCO₃ precipitado, 40 g; agar, 12 g) e os fungos filamentosos em meio de gelose de batata dextrosada (PDA, Difco, EUA), à temperatura de 4 °C. Posteriormente, as culturas bacterianas foram revitalizadas para meio de cultura Nutrient Dextrose Agar (NDA,) ou Nutrient Agar (NA, Difco, EUA), no caso das fermentativas, e os fungos para meio de cultura PDA, antes da sua utilização nos testes de atividade antimicrobiana.

Os critérios que presidiram à seleção de espécies/estirpes de agentes patogénicos das plantas foram distintos dos anteriormente referidos para o caso dos patogénicos do Homem. No caso das bactérias, foi objetivo incluir o número máximo de bactérias pertencentes ao Top 10 de bactérias mais importantes, quer do ponto de vista científico quer taxonómico (Mansfield *et al.*, 2012), disponíveis para estudo, como foram as seguintes:

- *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, uma das poucas bactérias Gram-positivas que atacam sobretudo o tomateiro e o pimento, transmissível por semente, constitui uma importante ameaça para estas culturas quer ao ar livre quer em cultura protegida (EFSA, 2014);
- *Agrobacterium tumefaciens*, bactéria Gram-negativa do solo é o agente causal do tumor bacteriano, uma das doenças bacterianas mais importantes em todo o mundo que afeta uma vasta gama de hospedeiros desde lenhosos, a herbáceos; constitui uma poderosa ferramenta para a engenharia genética e modelo para decifrar mecanismos de interação patogénio-hospedeiro;
- *Ralstonia solanacearum*, bactéria Gram-negativa do solo, considerada como a mais destrutiva em todo mundo; afeta uma larga gama de hospedeiros, principalmente plantas da família *Solanaceae* e *Musaceae*;
- *Xanthomonas campestris* (patovares), causam doenças de importância agronómica em todo o mundo e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* é um dos patogénicos mais importantes que afeta todas as *Brassicaceae* cultivadas;
- *Pectobacterium carotovorum* é agente causal de podridões húmidas em inúmeras culturas; taxonomicamente próxima de *E. coli* (Enterobacteriaceae), tem sido usada como modelo na área da biologia molecular para desvendar inúmeros mecanismos relacionados com a análise molecular da virulência ou dos mecanismos reguladores de “quorum sensing”, que ocorrem quer para patogénios de plantas como de animais;
- *Pseudomonas corrugata*, *P. mediterranea* e *P. viridiflava*, bactérias Gram-negativas envolvidas na medula-negra do tomateiro (Moura *et al.*, 2005), uma doença com elevada importância económica em Portugal;

- *Pseudomonas fluorescens*, complexo de espécies presente na rizosfera das plantas; inúmeras estirpes são usadas no controlo biológico de outros agentes patogénicos do solo, designadamente fungos (Couillerot *et al.*, 2009).;
- *Pseudomonas tolaasii* é uma bactéria Gram-negativa que origina doença (brown-blotch) em várias espécies de cogumelos cultivados e cujo controlo é muito difícil, pelo facto da cultura de cogumelos necessitar nas fases iniciais do seu crescimento da ação de bactérias taxonomicamente próximas (*Pseudomonas putida*) (Saxon *et al.*, 2014).

Relativamente aos fungos a testar, o critério que presidiu à seleção foi, por um lado incluir alguns mencionados no Top 10 dos fungos científica e economicamente mais importantes (Dean *et al.*, 2012), como foram os casos de *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum* spp., mas também que pudessem evoluir em pós-colheita, afetando citrinos (*Alternaria citri* e *Colletotrichum* spp.) e uma vasta gama de frutos e vegetais (*B. cinerea*, *Colletotrichum* spp. *S. vesicarium*). Por fim, incluiu-se ainda *Penicillium expansum*, por ser um importante agente de podridão de frutos em pós-colheita e por produzir micotoxinas, em especial a patulina, conhecida pelo seu efeito carcinogénico no Homem e animais (Andersen *et al.*, 2004).

3.5. Preparação de amostras para ensaios de atividade antimicrobiana

Preparou-se uma solução stock de 2 mg de cada amostra (OE e extratos) dissolvidos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) ou DMSO/tween 10% para as amostras mais polares. Esta solução de concentração 2 mg/mL foi usada nos ensaios com os fungos fitopatogénicos. A solução anterior foi ainda diluída para metade, obtendo-se uma solução de concentração 1 mg/mL, que por sua vez foi usada para os ensaios com os patógenos Humanos e com as bactérias fitopatogénicas.

3.6. Avaliação da atividade antimicrobiana de OE e de extratos

A avaliação da atividade antimicrobiana de OE e de extratos das espécies de *Lavandula* em estudo foi feita com recurso a diferentes métodos. Para bactérias, leveduras e *Aspergillus niger*, utilizou-se o método da diluição em meio líquido, de acordo com a norma CLSI M27-A3 e CLSI M38-A. No caso dos ensaios relativos a fungos filamentosos que atacam plantas, inicialmente estava previsto o estudo da inibição do crescimento micelial,

por incorporação de concentrações crescentes de OE e de extratos de *Lavandula* em meio de PDA contido em placas de Petri (técnica do meio tóxico), tal como referido por diferentes autores (Huang *et al.*, 2010; Camele *et al.*, 2012). Estes ensaios não puderam realizar-se, por não existir volume suficiente de OE e de extratos, nem ser possível realizar nova extração. Em consequência, ensaiaram-se técnicas alternativas (3.6.2), apenas com carácter preliminar.

3.6.1. Método da diluição em meio líquido

Este método, também denominado microdiluição ou micrométodo, foi usado para testar todos os agentes patogénicos humanos (Quadro 2) e as bactérias fitopatogénicas (Quadros 3 e 4). Permite determinar a menor concentração de amostra que inibe o crescimento de um microrganismo, correspondente à concentração mínima inibitória (CMI). Nele foram usadas microplacas NUNC de 96 poços, de fundo redondo.

De modo resumido, a cada poço foram adicionados 100 µL de meio MH e 100 µL de cada amostra (OE e extratos com concentração 1 mg/mL), que foram diluídos sucessivamente, obtendo-se concentrações de 7,5; 15,5; 31; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL. A cada poço adicionaram-se ainda 10 µL de uma suspensão do agente patogénico a testar (concentração final de 10^4 cfu/mL). Em cada placa foi incluído o branco de solvente e de bactéria, como controlos.

As placas foram incubadas na obscuridade, numa estufa a 37 °C durante 24 h para patogénios do Homem e a 25 °C durante 48 h para bactérias fitopatogénicas. Todos os ensaios foram feitos em triplicado. A determinação da CMI foi observada visualmente e confirmada por leitura da absorvância num leitor de microplacas (Biotek ELX808 ou Biotek Synergy HT) a um comprimento de onda de 630 nm. Apenas as concentrações de OE e de extratos que originam valores de $CMI \leq 100$ µg/mL devem ser consideradas com atividade antimicrobiana ou antifúngica, de acordo com as recomendações de Cos *et al.* (2006a; 2006b).

Para os agentes patogénicos humanos, como controlo positivo e como meio de comparação dos resultados obtidos com os resultados normalmente obtidos em farmacologia, foram feitos CMI e E-test (Epsilometer test) com os antibióticos e antifúngicos aconselhados: mencilina, vancomicina e ofloxacina como antibióticos e anfotericina B e fluconazol como antifúngicos. O E-test consiste em espalhar uma suspensão aquosa do microrganismo a inibir numa placa de Petri com meio de Sabouraud ou PDA. Nessa mesma placa é adicionado uma tira de papel impregnada no topo com a substância a testar, que irá difundir-se pela tira em concentrações cada vez mais baixas. A placa é incubada 24 h, após

o qual o microrganismo cresceu e o halo de inibição em volta do gradiente da substância é visível.

3.6.2. Método da difusão em meio sólido

Este método consiste na utilização de discos de papel de filtro embebidos na amostra a testar (OE ou extrato) numa concentração pré-estabelecida, colocados na superfície de uma placa de Petri contendo meio sólido apropriado (PDA) inoculado com o microrganismo cuja suscetibilidade se pretende avaliar. Os compostos presentes na amostra difundem-se para o meio circundante, formando um gradiente de concentração que decresce da periferia do disco para distâncias mais elevadas. Os microrganismos multiplicam-se em toda a superfície do meio gelosado, exceto em torno do disco impregnado com o composto ao qual são sensíveis. As zonas de inibição tornam-se visíveis pela formação de um halo em redor do disco. A eficácia do composto aplicado no disco é avaliada preliminarmente pelo diâmetro do halo de inibição formado, sendo a inibição do crescimento de cada um dos fungos calculada como a percentagem de inibição do crescimento radial em relação ao controlo negativo (Hossain *et al.*, 2008).

3.6.2.1. Inoculação por sementeira de esporos

Cada um dos fungos fitopatogénicos filamentosos em estudo foi incubado em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo PDA, à temperatura de 25 °C, na obscuridade, durante uma semana. Decorrido este período as placas foram inundadas com 5 mL de água destilada. A suspensão obtida foi filtrada através de gaze esterilizada, para remoção do micélio, e diluída em água destilada esterilizada de forma a dosear aproximadamente 10^6 esporos/mL. Seguidamente, inocularam-se placas de PDA com 100 µL de cada uma das suspensões de esporos, que foram uniformemente espalhados na superfície do meio de cultura com o auxílio de uma vareta de vidro dobrada em L. Traçou-se o diâmetro da placa e colocaram-se equidistantes do centro, um disco de papel de filtro Whatman de diâmetro 0,5 cm embebido em 5 µL da amostra a testar (OE ou extrato com concentração 1 mg/mL) e em posição oposta um disco de papel de filtro de igual diâmetro embebido em água destilada esterilizada (controlo negativo). As placas foram imediatamente seladas com Parafilm e colocadas em estufa de incubação a 25 °C, na obscuridade. Os resultados foram registados após 3 e 7 dias de incubação. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

3.6.2.2. Inoculação por discos de micélio

Neste método procedeu-se de forma análoga à anteriormente descrita no que se refere às condições para obtenção de culturas. Em cada uma das placas de Petri a inocular traçou-se o respetivo diâmetro e colocaram-se, equidistantes do centro, num dos semi-círculos da placa um disco de papel de filtro Whatman (0,5 cm diâmetro) embebido em 5 µL da amostra a testar, à concentração de 2 mg/mL e no outro um disco de micélio de 3 mm de diâmetro, retirado da periferia de colónias de cada um dos fungos em ensaio. Os fungos tinham sido incubados à temperatura de 25 °C, na obscuridade, em placas de Petri de 90 mm contendo PDA, durante aproximadamente 7 dias. Para cada fungo, foram ainda feitas placas de controlo, iguais às anteriores, mas com o papel embebido em água destilada e esterilizada, em substituição da amostra (OE ou extrato). Todos os ensaios foram realizados em duplicado, incubados a 25 °C, no escuro, e observados após 3 e 7 dias.

4. Resultados e Discussão

4.1. Extração de óleos essenciais e extratos

Através do método da hidrodestilação obtiveram-se 1,4 g de OE de *L. stoechas* subsp. *luisieri* e 12,78 g de OE de *L. pedunculata*, sendo o rendimento em OE de 0,85 % para *L. stoechas* subsp. *luisieri* e de 5,4 % para *L. pedunculata*, por conseguinte, muito superior.

Feijão (2011) trabalhou com estas espécies colhidas no mesmo local, como já foi referido, e obteve um rendimento de 0.1-0.7 % (v/p) para *L. stoechas* subsp. *luisieri* e de 2 % (v/p) para *L. pedunculata*. Ambos os estudos confirmam a superioridade do rendimento em OE para *L. pedunculata*, embora as diferenças observadas possam ser atribuídas a variações nas condições laboratoriais, no manuseamento e na extração (Figueiredo *et al.*, 2008).

A obtenção dos extratos seguiu a metodologia normal para este processo laboratorial e os valores de rendimento obtidos foram semelhantes para as duas plantas, embora ligeiramente superiores para *L. pedunculata* (Quadro 5).

Quadro 5 - Rendimentos dos extratos obtidos nos dois taxa

Taxon	Extrato	Rendimento (% v/p)
<i>L. stoechas</i> subsp. <i>luisieri</i>	n-hex	0,7
	CH ₂ Cl ₂	2
	AcOEt	1,6
	MeOH	2,,5
	H ₂ O	4,6
<i>L. pedunculata</i>	n-hex	1.7
	CH ₂ Cl ₂	2.8
	AcOEt	1,8
	MeOH	2,8
	H ₂ O	5,6

4.2. Ensaios de atividade antimicrobiana

Foram utilizados diferentes métodos na determinação da atividade antimicrobiana de OE e extratos de diferentes polaridades obtidos das duas espécies de *Lavandula* em estudo, consoante se tratavam de microrganismos patogénicos do Homem e bactérias fitopatogénicas ou fungos filamentosos fitopatogénicos. Ainda no caso de patogénios do Homem, os microrganismos selecionados foram bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e fungos, sensíveis e resistentes a antibióticos e a compostos antifúngicos.

4.2.1. Determinação de CMI das amostras para agentes patogénicos humanos

Os valores de CMI dos OE e dos extratos das duas espécies de *Lavandula* em estudo, para os vários microrganismos testados, estão apresentados nos Quadros 6 e 7. As Figuras 3 e 4 representam duas placas inoculadas com dois microrganismos diferentes: uma com *Aspergillus niger*, onde se obtiveram resultados positivos (Figura 3) e outra com *Pseudomonas aeruginosa*, onde não se observaram inibições acima de 250 µg/mL (Figura 4). Consideraram-se resultados positivos de inibição dos patogénios, quando o valor de CMI, correspondente à menor concentração de amostra que inibe o crescimento do microrganismo, foi inferior a 100 µg/mL. Todas as amostras (OE e/ou extratos) revelaram alguma atividade antimicrobiana, num ou noutro microrganismo.

Quadro 6 - Resultados de CMI obtidos com as amostras de *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*

Microrganismo	Referência	OE	CMI (µg/mL)				
			Extrato				
			<i>n</i> -hex	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	MeOH	H ₂ O
Bactéria Gram-Positiva							
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP 104676 CIP 106996	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	>100	>100	>100	62,5	>100	62,5
	ATCC 9144	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	ATCC 43300						
	ATCC 25923						
	ATCC 106760						
	CIP 106366 CIP 106414						
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Bactéria Gram-Negativa							
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11105	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10231	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Bactéria Álcool-Ácido Resistente							
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 607	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Fungo							
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404	15,5	7,5	31	>100	62,5	>100
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028	>100	>100	62,5	>100	>100	>100
<i>C. dubliniensis</i>	FFUL 21	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>C. glabrata</i>	FFUL12B	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>C. guilliermondii</i>	FFUL 1403	62,5	>100	>100	>100	>100	>100
<i>C. kruzei</i>	ATCC 6258	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 90018	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 750	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Cryptococcus neoformans</i>	FFUL 948	15,5	31	31	31	62,5	62,5
<i>Rhodotorula rubra</i>	FFUL190	>100	>100	>100	31	>100	>100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FFUL 1997	31	62,5	62,5	62,5	31	62,5
<i>Tricosporon cutaneum</i>	FFUL 18H	31	>100	>100	>100	62,5	62,5

As amostras de *L. stoechas* subsp. *luisieri* apresentaram atividade para *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Tricosporon cutaneum* (Quadro 6). 50 % das amostras testadas relativamente a estes microrganismos mostraram atividade, com CMI entre 7,5 e 62,5 µg/mL. O valor mais baixo (CMI 7,5 µg/mL), ou seja, a menor concentração de amostra necessária para inibir o microrganismo, foi obtida com extrato de *n*-hex em *A. niger*. Os restantes microrganismos não referenciados apresentaram CMI > 100 µg/mL, pelo que não foram valorizados.

Das 15 bactérias patogénicas humanas testadas, apenas a estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, uma bactéria Gram-positiva, foi sensível às amostras, sendo inibida pelos extratos de AcOEt e aquoso (CMI 62,5 µg/mL). Esta é uma estirpe de elevada importância, pois adquire facilmente resistência a antibióticos e está largamente associada à tuberculose e ao HIV/SIDA (Boucher *et al.*, 2009). *S. aureus* ATCC 6538 foi selecionada por ser uma estirpe ainda sensível a antibióticos e, provavelmente, devido à sua sensibilidade, foi inibida pelas amostras. Nenhuma outra bactéria Gram-positiva foi inibida pelos OE ou extratos, nem as bactérias Gram-negativas e a álcool-ácido resistente testada. Estes resultados para as bactérias Gram-negativas devem-se a estas possuírem na parede celular uma camada fina de peptidoglicano ou mureína, lipopolissacáridos e lipoproteínas. A presença de lipopolissacáridos na parede celular confere-lhe carga negativa, repelindo compostos hidrofóbicos, como alguns antibióticos, e tornando-a impermeável. Apenas pequenas moléculas polares têm capacidade de atravessar esta barreira usando proteínas transmembranares, porinas, presentes sobretudo em microrganismos Gram-negativos (Nazzaro *et al.*, 2013).

A bactéria *Mycobacterium smegmatis*, ácido-álcool resistente, não foi inibida pelas amostras avaliadas. Esta bactéria possui uma dupla membrana externa de natureza lipídica, a mais espessa membrana biológica conhecida e com baixíssima permeabilidade, o que torna estas bactérias intrinsecamente resistentes a inúmeros antibióticos hidrofílicos, embora alguns usem porinas para entrarem na célula (Niederweis, 2003). Ainda assim, Danilchanka *et al.* (2008) referem que antibióticos hidrofóbicos são muito mais eficazes na inibição de *M. smegmatis*, provavelmente porque têm a capacidade de se difundir através da membrana lipídica. Assim sendo, não seria de estranhar que os OE testados tivessem atuado em relação a esta bactéria.

Em relação aos fungos testados, *Aspergillus niger*, um fungo filamentoso, foi inibido pelo OE (CMI 15,5 µg/mL) e pelos extratos de *n*-hex e CH₂Cl₂ (CMI 7,5 – 62,5 µg/mL) (Figura 3).

No grupo das leveduras, *Candida albicans* e *C. guilliermondii* sofreram inibição com o extrato de CH₂Cl₂ (CMI 62,5 µg/mL) e com o OE (CMI 62,5 µg/mL), respetivamente. Por

outro lado, apenas o extrato de ACOEt (CMI 31 µg/mL) mostrou atividade contra *Rhodotorula rubra*. Estes três últimos microrganismos foram os menos sensíveis às amostras, uma vez que cada um deles foi inibido apenas por uma das amostras.

Tricosporon cutaneum foi inibido pelo OE (CMI 31 µg/mL) e pelos extratos metanólico (CMI 62,5 µg/mL) e aquoso (CMI 62,5 µg/mL). OE e todos os extratos mostraram atividade contra *Cryptococcus neoformans* (CMI 15,5 – 62,5 µg/mL), assim como contra *Saccharomyces cerevisiae* (CMI 31 – 62,5 µg/mL).

Quadro 7 - Resultados de CMI obtidos com as amostras de *Lavandula pedunculata*

Microrganismo	Referência	OE	CMI (µg/mL)				
			Extrato				
			<i>n</i> -hex	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	MeOH	H ₂ O
Bactéria Gram-Positiva							
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP 104676 CIP 106996	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>E. hirae</i>	ATCC 10541	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	>100	>100	>100	62,5	>100	>100
	ATCC 9144	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	ATCC 43300						
	ATCC 25923						
	ATCC 106760 CIP 106366 CIP 106414						
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Bactéria Gram-Negativa							
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11105	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10231	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Bactéria Álcool-Ácido Resistente							
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 607	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Fungo							
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>C. dubliniensis</i>	FFUL 21	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>C. glabrata</i>	FFUL12B	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>C. guilliermondii</i>	FFUL 1403	62,5	62,5	>100	>100	>100	>100
<i>C. kruzei</i>	ATCC 6258	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 90018	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 750	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Cryptococcus neoformans</i>	FFUL 948	15,5	31	15,5	15,5	15,5	62,5
<i>Rhodotorula rubra</i>	FFUL190	62,5	62,5	62,5	>100	>100	>100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FFUL 1997	>100	31	31	>100	>100	62,5
<i>Tricosporon cutaneum</i>	FFUL 18H	62,5	31	31	>100	>100	>100

Lavandula pedunculata mostrou atividade antimicrobiana contra *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Rhodotorula rubra* e *Tricosporon cutaneum* (Quadro 7). Embora tenha mostrado

atividade contra menos microrganismos, 54 % das amostras mostraram atividade com valores de CMI entre os 15,5 e os 62,5 µg/mL. As amostras desta espécie, ao contrário da anterior, não inibiram o fungo *Aspergillus niger* (Figura 3).

O extrato de AcOEt de *L. pedunculata* (CMI 62,5 µg/mL) foi a única amostra que mostrou atividade contra bactérias. Apenas a bactéria Gram-positiva, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 foi inibida pelo extrato, tal como o sucedido com o outro *taxon*. *Candida guilliermondii* foi a única espécie de *Candida* a sofrer inibição, do OE e do extrato de *n*-hex (CMI 62,5 µg/mL). *Saccharomyces cerevisiae* foi inibida pelos extratos de *n*-hex, CH₂Cl₂ e aquoso (CMI 31 - 62,5 µg/mL). OE, extrato de *n*-hex e extrato de CH₂Cl₂ apresentaram atividade para *Rhodotorula rubra* (CMI 62,5 µg/mL) e *Tricosporon cutaneum* (CMI 31 - 62,5 µg/mL). Todas as amostras mostraram atividade para *Cryptococcus neoformans* (CMI 15,5 - 31 µg/mL).

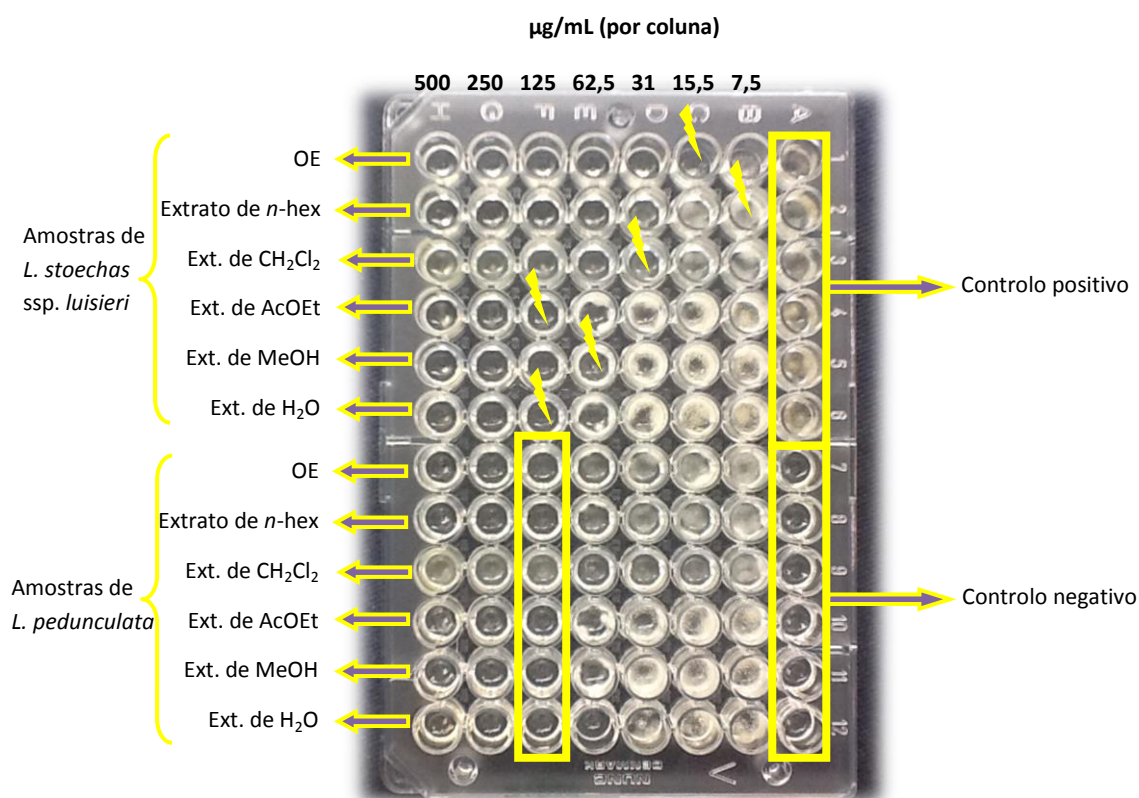


Figura 3 – Exemplo de resultados CMI de *Aspergillus niger*.

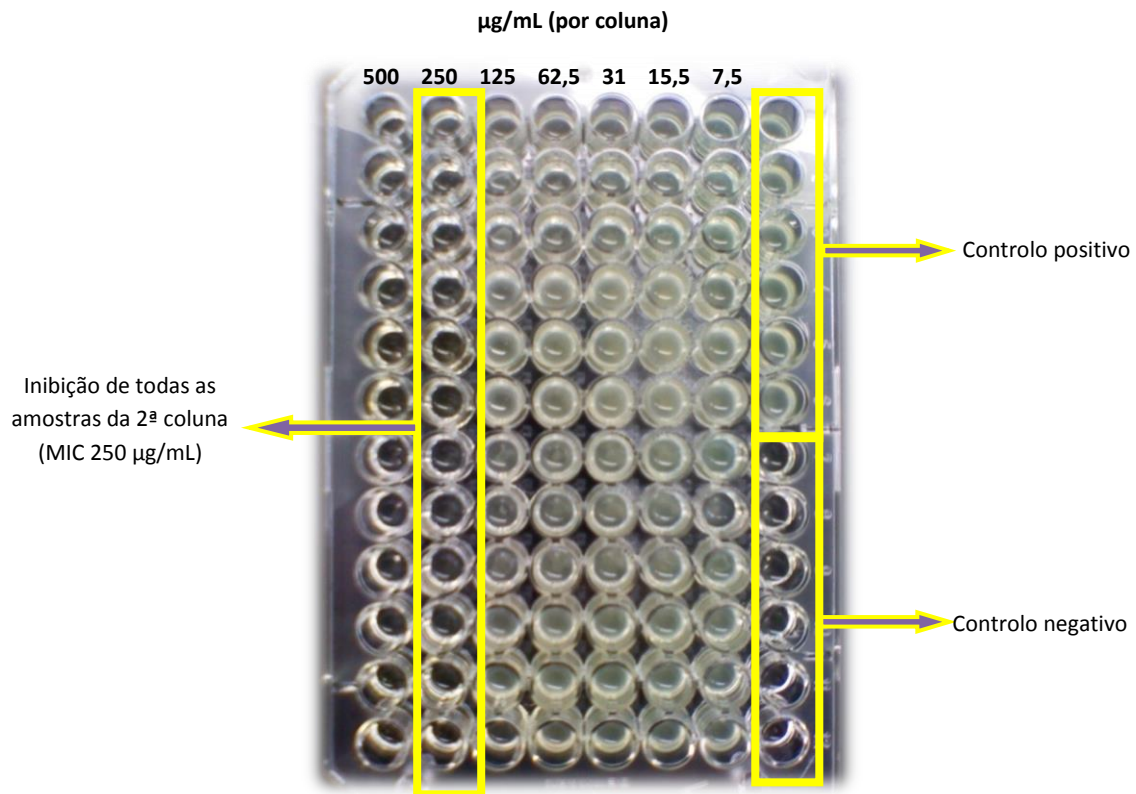


Figura 4 - Exemplo de resultados CMI de *Pseudomonas aeruginosa*.

No Quadro 8 encontram-se os resultados obtidos no controlo positivo com o recurso a antibióticos de referência, através de E-test (Epsilon meter test). Na Figura 5 encontram-se dois exemplos de E-test.

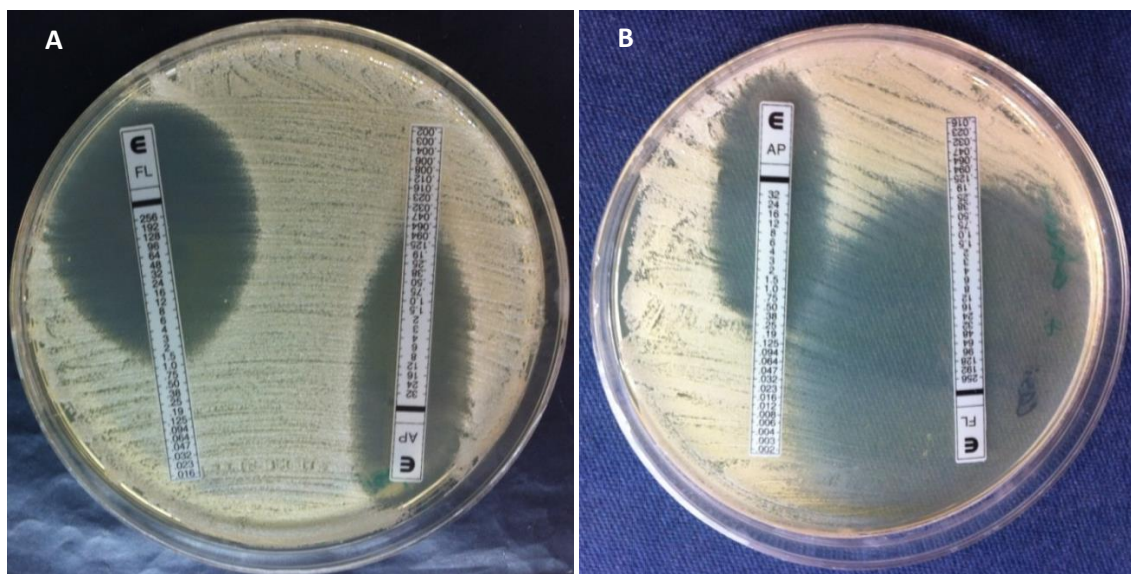


Figura 5 - Exemplo de E-test a *Rhodotorula rubra* (A) e *Trichosporon cutaneum* (B) para fluconazol (tira FL) e anfotericina B (tira AP).

Quadro 8 - Resultados obtidos nos controlos positivos através de E-test (Epsilometer test)

Microrganismo	Referência	CMI obtido para antibióticos de referência (µg/mL)
Bactérias Gram Positivas		
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Vancomicina 1.5 e ofloxacina 1.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP 104676	Vancomicina 16
	CIP 106996	Vancomicina 4
<i>E. hirae</i>	ATCC 10541	Oxacilina 1.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Mencilina 0.125 e vancomicina 0.75
	ATCC 9144	-
	ATCC 43300	Mencilina 256 e ofloxacina -
	ATCC 25923	Mencilina 32 e vancomicina 1.5
	ATCC 106760	Mencilina 255 e vancomicina 4
	CIP 106366	-
	CIP 106414	-
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	Oxacilina 0.5
Bactérias Gram Negativas		
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11105	Ofloxacina 1.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10231	Ofloxacina 1.5
Bactérias Álcool-Ácido Resistentes		
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 607	Rifampicina 1.5
Fungos		
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404	-
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028	Anfotericina B 0.125
<i>C. dubliniensis</i>	FFUL 21	Anfotericina B 0.47 e fluconazol 1
<i>C. glabrata</i>	FFUL 12B	Anfotericina B 0.125 e fluconazol 6
<i>C. guilliermondii</i>	FFUL 1403	Anfotericina B 0.064 e fluconazol 12-16
<i>C. kruzei</i>	ATCC 6258	Anfotericina B 0.125 e fluconazol 12
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 90018	Anfotericina B 0.125 e fluconazol 12
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 750	Anfotericina B 0.125 e fluconazol 1.5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	FFUL 948	Anfotericina B 0.125 e fluconazol 6
<i>Rhodotorula rubra</i>	FFUL 190	Anfotericina B 0.094 e fluconazol 2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FFUL 1997	Anfotericina B 0.016 e fluconazol 0.5
<i>Tricosporon cutaneum</i>	FFUL12B	Anfotericina B 0.25 e fluconazol 0.19

As CMI obtidas pelas amostras foram em concentrações mais altas às obtidas pelos antibióticos e antifúngicos, no entanto existem alguns químicos que inibem a valores muito altos, como por exemplo a mencilina para *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (CMI 256 µg/mL). Assim, podemos concluir que os OE e extratos destas espécies de *Lavandula* podem não apresentar valores considerados como positivos, mas serem eficazes contra

alguns microrganismos estudados. Estas amostras não devem por isso ser descartadas de imediato.

Nas Figuras 6 e 7 apresentam-se as amostras de cada *taxon* em estudo e as CMI obtidas para os microrganismos mais sensíveis: *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Tricosporon cutaneum*. Podemos verificar que as amostras de *L. stoechas* subsp. *luisieri* mostraram CMI para um número superior de microrganismos. Para *L. stoechas* subsp. *luisieri* o extrato que mais microrganismos inibiu foi o de CH₂Cl₂ e o de AcOEt e para *L. pedunculata* foi o extrato de *n*-hex. Podemos ainda observar que *Cryptococcus neoformans* foi o microrganismo mais sensível às amostras, tendo sido inibido por todos os OE e extratos testados, apresentando valores de CMI entre 15,5 – 62,5 µg/mL. Este fungo aparece nos excrementos dos pombos, propagando-se por inalação. É oportunista, afetando com frequência doentes de SIDA e doentes com sistema imunitário debilitado, provocando meningite fúngica e encefalite (Casali *et al.*, 2001).

É notório que as amostras de *L. stoechas* subsp. *luisieri* são mais ativas do que as de *L. pedunculata*, apresentando valores de CMI mais baixos, o que significa maior eficácia. Segundo Feijão (2011), os OE de *L. stoechas* subsp. *luisieri* são mais ricos em derivados de necrodol, o que parece provocar uma maior atividade inibitória. Os OE de *L. pedunculata*, por sua vez, são mais ricos em fenchona e cineol, pelo que as discrepâncias nas atividades dos OE dos *taxa* podem estar associadas a esta diferença na composição química dos mesmos.

Verifica-se que *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae* foram bastante sensíveis às amostras. *A. niger* foi inibido pelo OE e extratos de *n*-hex, CH₂Cl₂ e metanólico com valores de CMI muito baixos, entre 7,5 – 62,5 µg/mL. Por sua vez, *S. cerevisiae* foi inibido por todas as amostras, apresentando valores de CMI com pouca variação (31 – 62,5 µg/mL). Existe uma diferença entre a atividade dos extratos mais apolares de *L. stoechas* subsp. *luisieri*, comparativamente aos mesmos extratos de *L. pedunculata*, que mostraram pouca atividade perante os microrganismos testados. Extratos de diferentes polaridades apresentam compostos distintos, pelo que é de esperar divergências nos resultados.

Também o extrato aquoso de *L. stoechas* subsp. *luisieri* apresentou efeitos inibidores, com valores de CMI de 62,5 µg/mL. Este resultado mostra a importância do estudo dos extratos nas plantas aromáticas e suas atividades, poucas vezes consideradas, dando-se apenas importância aos OE. Além disso, os extratos aquosos têm elevada importância por serem os mais acessíveis ao público, através da medicina popular sob a forma de infusões.

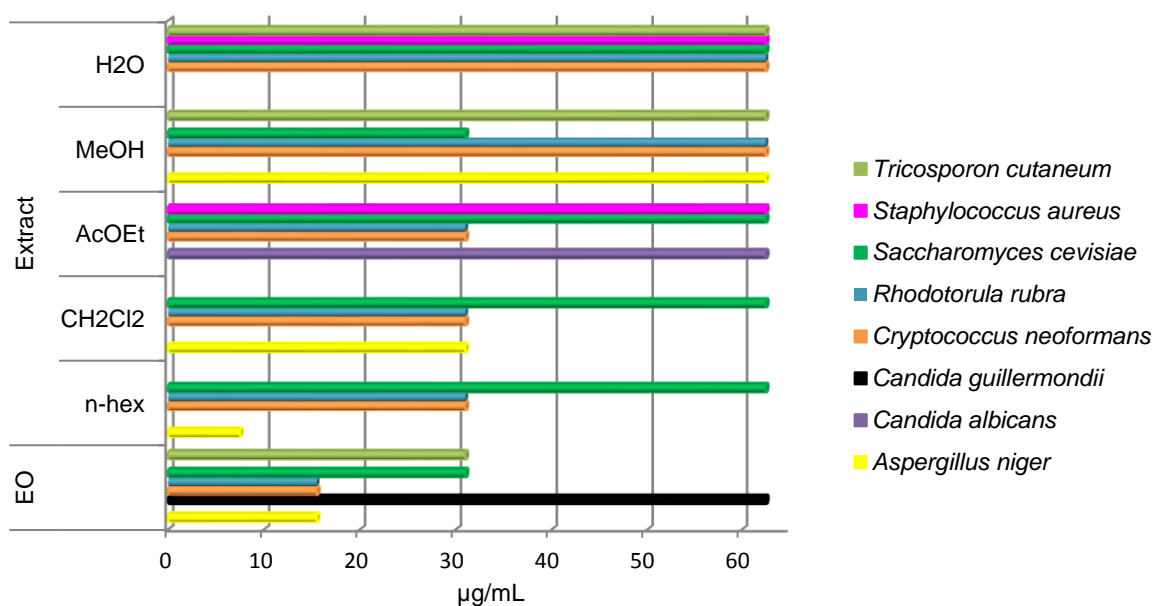


Figura 6 – Resultados positivos de inibição de microrganismos (CMI < 100 µg/mL) resultantes da utilização de óleo essencial (OE) e extratos de *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri*.

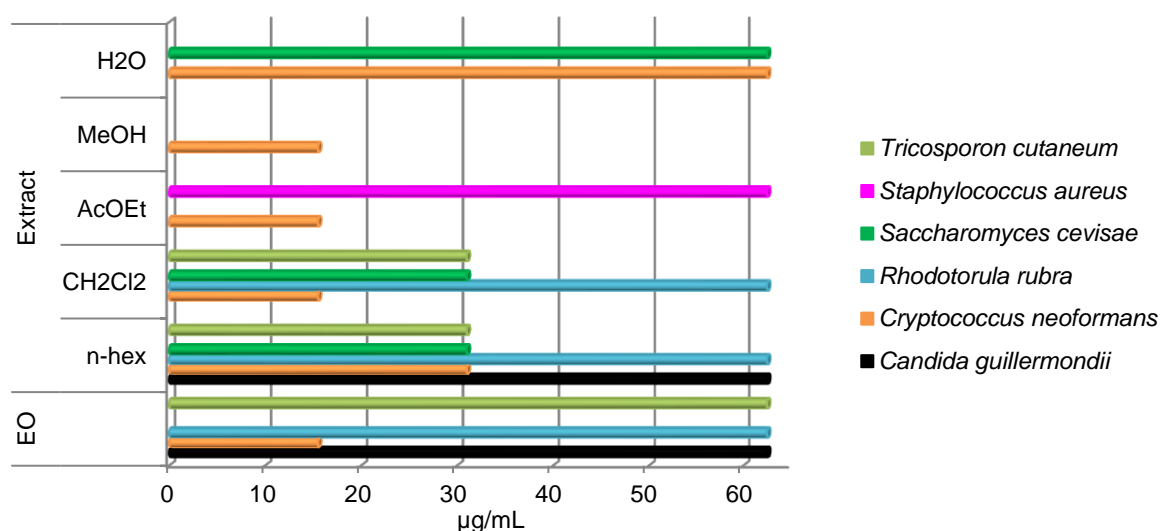


Figura 7 - Resultados positivos de inibição de microrganismos (CMI < 100 µg/mL) resultantes da utilização de óleo essencial (OE) e extratos de *L. pedunculata*.

Teixeira *et al.* (2012) trabalharam com extratos (*n*-hex, CH₂Cl₂, AcOEt, MeOH e H₂O) de *L. stoechas* subsp. *luisieri* e *L. pedunculata*, materiais provenientes dos mesmos locais das nossas amostras, para avaliação de atividade antimicrobiana. Os autores observaram que os extratos de *L. stoechas* spp. *luisieri* apresentavam atividade moderada em relação a estirpes de *S. aureus* e a outras bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus faecalis*, com valores de CMI de 62,5 µg/mL. O extrato metanólico foi a

única amostra a inibir a bactéria Gram-negativa, *Klebsiella pneumoniae*. *Mycobacterium smegmatis* foi fortemente inibida com os extratos de CH₂Cl₂, MeOH e aquoso. Por outro lado, o extrato de CH₂Cl₂ de *L. pedunculata* foi o único desta espécie a inibir moderadamente *M. smegmatis* (CMI 62,5 µg/mL). Os autores sugerem que os compostos terpénicos existentes nos extratos, ao contrário do que outros autores defendem (Hammer *et al.*, 1999; Lis-Balchin *et al.*, 1988), podem não ser os únicos responsáveis pelos resultados inibitórios. Após um perfil fitoquímico dos mesmos, os autores observaram que as amostras eram ricas em flavonóides, compostos terpénicos e fenólicos, sendo que as amostras de *L. pedunculata* apresentavam menos teor em compostos terpénicos e fenólicos. Deste modo, os mesmos sugerem que os efeitos inibitórios dos extratos podem estar associados a um efeito sinérgico entre compostos terpénicos, fenólicos e flavonóides.

As bactérias/estirpes Gram-negativas utilizadas por aqueles autores não foram as mesmas por nós utilizadas e a diferença de resultados com *M. smegmatis* e *S. aureus* pode estar relacionada com diferentes condições laboratoriais.

Baldovini *et al.* (2009) trabalharam com OE de *L. stoechas* subsp. *luisieri* e demonstraram que os mesmos apresentavam atividade contra bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *S. pyogenes*, mais uma vez reforçando a ideia da potencialidade destes OE na inibição das bactérias Gram-positivas, especialmente *S. aureus*, como verificado no presente estudo.

Zuazua *et al.* (2009) trabalharam com OE de *L. pedunculata* colhida no Sul de Portugal, com o 1,8-cineol como constituinte maioritário do OE. Foi realizada a avaliação da atividade antifúngica sobre dermatófitos. Os autores verificaram através do método de CMI que os OE desta espécie apresentavam efeitos inibitórios muito bons em *Cryptococcus neoformans* e bastante mais baixos em estirpes variadas de *Aspergillus* e *Candida*. Os nossos resultados, obtidos com o mesmo quimiótipo, também indicam que o OE deste *taxon* inibe *C. neoformans*, embora seja uma estirpe diferente da estudada pelos autores acima, no entanto não observámos inibições para o isolado de *Aspergillus niger* testado e para a maioria das estirpes de *Candida*, apenas *C. guilliermondii* foi inibida.

Zuazua *et al.* (2011) estudaram também os OE de *L. viridis*, colhida no sul de Portugal, e a sua ação antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* e várias estirpes de *Candida*, *Aspergillus* e fungos dermatófitos. Os autores caracterizaram o OE como rico em 1,8-cineol, cânfora, α -pineno e linalol, e observaram que a maior ação antifúngica foi verificada contra os fungos dermatófitos testados e *C. neoformans*. Outras estirpes de *Candida* também sofreram inibição, enquanto que as de *Aspergillus* foram menos inibidas. Foi ainda estudada a ação isolada dos principais constituintes do OE: o 1,8-cineol e a cânfora foram os constituintes que menor atividade manifestaram, sendo o α -pineno o constituinte que maior atividade apresentou, especialmente contra dermatófitos. De resto,

para estes autores, no género *Lavandula*, o constituinte com maior atividade antifúngica é o α -pineno. Nos OE das espécies do nosso estudo, este não é o composto maioritário (Quadro 1) mas apesar disso ambos os estudos apresentam resultados coincidentes quanto à atividade de OE e extratos contra *C. neoformans*.

Outros autores (Shafaghat *et al.*, 2011) trabalharam com OE rico em 1,8-cineol, extrato de *n*-hex e extrato de MeOH de *L. officinalis*, para avaliação da atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* e concluíram que o OE e o extrato de MeOH apresentam atividade inibitória contra todos os microrganismos estudados, ao contrário do extrato de *n*-hex que mostrou atividade moderada contra todos os microrganismos testados, exceto duas bactérias Gram-negativas resistentes, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, bem como o fungo *A. niger*. No geral, os microrganismos mais sensíveis foram *S. epidermidis* e *S. aureus*.

Também Blazekovic *et al.* (2011) estudaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Lavandula x intermedia*, rica em polifenóis, linalol e acetato de linalil. Os autores compararam a ação do extrato obtido das flores, folhas e caules, concluindo que o material vegetal influencia a capacidade inibitória do extrato, pelo que o extrato obtido das flores inibiu todas as bactérias estudadas (Gram-positivas e negativas), sendo *Pseudomonas aeruginosa* a mais sensível. Por outro lado, os extratos obtidos das folhas ou dos caules não inibiram bactérias Gram-negativas. No entanto, todos os extratos inibiram *Streptococcus pyogenes*. Todos os fungos dermatófitos estudados foram sensíveis aos extratos, sendo *Candida kruzei* o mais afetado. Mais uma vez, os *taxa* estudados não correspondem aos nossos, bem como os microrganismos testados, no entanto observa-se que, tal como no presente estudo, também o OE e os extratos mais apolares apresentaram ação inibitória, devido a ambos terem uma composição química rica em compostos terpénicos.

Segundo Chu & Kemper (2001), a atividade antifúngica dos OE de *Lavandula* sp. é atribuída aos compostos 1,8-cineol, α e β -pineno, *p*-cimeno e linalol. Estes autores referem ainda que os compostos presentes nestes OE, responsáveis pela atividade antibacteriana, são o linalol, o α -terpineol, o terpen-4-ol, a cânfora, o eugenol e o ácido rosmarínico. Nos *taxa* estudados ao longo deste trabalho, o 1,8-cineol está presente em maiores quantidades em *L. pedunculata* (Quadro 1). Provavelmente essa será a razão para um maior número de amostras ter inibido *C. guillermondii* e *R. rubra*, embora não tenha inibido *A. niger* nem *C. albicans*. Por outro lado, devido ao teor mais elevado de cânfora em *L. stoechas* subsp. *luisieri* (Quadro 1), *S. aureus* ATCC 6538, única bactéria sensível às amostras, foi inibida por mais amostras deste *taxon* do que por *L. pedunculata*.

Segundo alguns autores (Woronuk *et al.*, 2011; Cavanagh & Wilkinson, 2002), os OE das espécies de *Lavandula* com maior teor de monoterpenos e sesquiterpenos são os preferíveis para a cosmética e perfumaria. *L. angustifolia* é a espécie mais usada nessa área. O seu OE é composto essencialmente por linalol (20-45%), ácido linalilo (25-46%), ácido lavandulilo, cânfora, cineol, lavandulol, limoneno, 3-octanona, terpinen-4-ol e α -terpineol. O OE desta espécie tem ação antiespasmódica e sedativa, antibacteriana e antifúngica. O próprio hidrolato obtido na extração do OE é usado na dermatologia como refrescante e anti-inflamatório para peles delicadas e jovens com acne, devido a estimular a regeneração celular. Os OE das espécies do nosso estudo com uma composição química diferente (Feijão, 2011), apresentam por isso atividades diferentes e poderão ser usadas em áreas que não a cosmética e perfumaria.

Outro aspeto importante é que, mesmo que os OE e os extratos destas espécies em estudo não sejam diretamente usados para diminuir a atividade de agentes patogénicos, algumas das moléculas dos compostos seus constituintes podem ser usadas como modelos químicos para novas moléculas com atividade antimicrobiana obtidas por hemissíntese ou síntese total (Cos *et al.*, 2006a).

4.2.2. Determinação de CMI das amostras para agentes fitopatogénicos

Os valores de CMI dos OE e dos extratos das duas espécies em estudo, para os vários microrganismos fitopatogénicos testados estão apresentados no Quadro 9. Mais uma vez, considerámos apenas resultados positivos quando o valor de CMI era inferior a 100 $\mu\text{g/mL}$. Assim sendo, nenhuma amostra (OE e extratos) mostrou atividade antimicrobiana, pelo que nenhum microrganismo foi sensível às amostras tanto de *L. pedunculata* como de *L. stoechas* subsp. *luisieri*.

As bactérias fitopatogénicas são na sua larga maioria Gram-negativas, o que as torna pelas características da parede celular mais resistentes à ação de produtos antimicrobianos. Ainda assim, foi incluída no estudo *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, uma bactéria Gram-positiva para a qual seriam mais expectáveis resultados positivos. É possível que aumentando a concentração dos OE e dos extratos de *Lavandula* spp. tal viesse a acontecer. Aliás, um estudo relativamente recente efetuado por Talibi *et al.* (2011) refere atividade antimicrobiana positiva de extratos de *Lavandula coronopifolia* Poirlet e de *L. stoechas* L. em relação a *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, mas para valores de CMI de 6,25 mg/mL , ou seja incomparavelmente superiores aos testados nestes ensaios, onde foram seguidas as recomendações de Cos *et al.* (2006a).

Quadro 9 - Resultados de CMI obtidos com as amostras de *L. pedunculata* e *L. stoechas* subsp. *luisieri*

Microrganismo	Referência	OE	CMI (µg/mL)				
			Extrato				
			<i>n</i> -hex	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	MeOH	H ₂ O
Bactéria Gram Positiva							
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	INIAV 1455	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Bactéria Gram Negativa							
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> biovar 1	AG 12	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Agrobacterium</i> sp.	LPVVA2	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pectobacterium</i> sp.	CFBP 5658	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	INIAV 1324	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas corrugata</i> type strain	CFBP 2431	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar 6	CFBP 5756	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas mediterranea</i> type strain	CFBP 5447	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas tolaasii</i> type strain	CFBP 2068	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas viridiflava</i> type strain	CFBP 2107	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Ralstonia solanacearum</i>	INIAV 932 , 1345, 1346, 1361, 1458 e 1462	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Raphani</i>	CFBP 2068	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestres</i>	HO – Amostra 1 HO – Amostra 3	>100 >100	>100 >100	>100 >100	>100 >100	>100 >100	>100 >100

Também para *Ralstonia solanacearum* existem diversos estudos de atividade antibacteriana de OE e extratos de diversas plantas mas, mais uma vez, os valores de CMI estão muito para além do valor utilizado neste estudo. A título de exemplo, cita-se Wagura *et al.* (2011) que obtiveram resultados positivos de inibição desta bactéria recorrendo a OE e extratos de *Ocimum gratissimum* L., mas para concentrações compreendidas entre 250-4000 µg/mL e usando o método dos discos

4.2.3. Método da difusão em meio sólido com inoculação por sementeira de esporos e por discos de micélio

Devido à elevada esporulação de alguns fungos testados, o ensaio da sementeira de esporos (Figura 8), com amostras (OE e extratos) de concentração de 1mg/mL, não originou resultados fiáveis, pelo que foi feito em seguida o método dos discos de micélio (Figura 9), com amostras de concentração de 2 mg/mL. Este método indicou que os fungos

filamentosos fitopatogénicos não eram sensíveis a OE e extratos de *Lavandula* spp., a concentrações inferiores a 2 mg/mL, não ocorrendo qualquer inibição de crescimento.

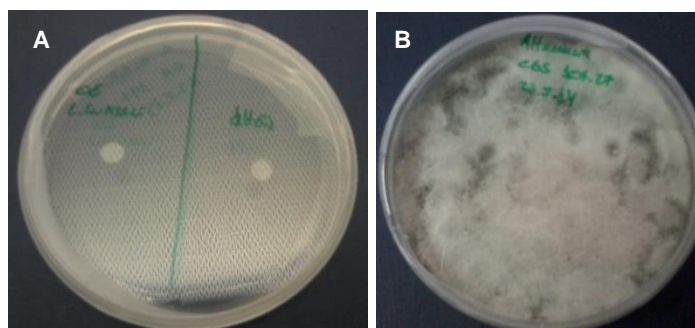


Figura 8 - Exemplo de ensaio de inibição de *Alternaria citri*, pelo método da sementeira de esporos: A - Montagem do ensaio com placa de Petri inoculada com esporos de *A. citri* e contendo, à esquerda, disco de papel de filtro embebido no extrato a testar e, à direita, disco embebido em água destilada esterilizada; B - Resultado observado, decorridos 7 dias de incubação à temperatura de 25°C, na obscuridade, onde se nota ausência de halo de inibição em torno do disco contendo a amostra.

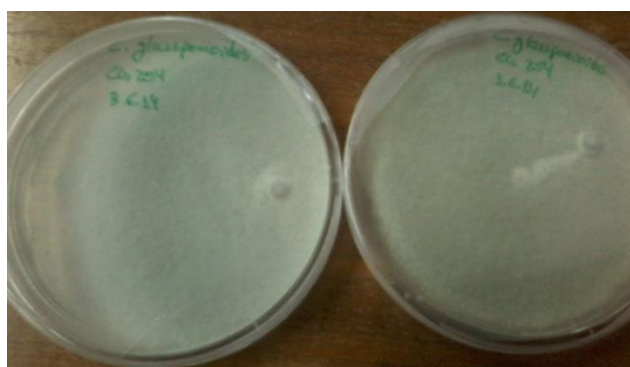


Figura 9 - Resultado do método dos discos para *Colletotrichum gloesporioides* (esquerda com amostra e direita com controlo negativo).

A título de exemplo refere-se um estudo realizado por Hossain *et al.* (2008) com OE e extratos crus de *Orthosiphon stamineus* Benth, uma planta da família Lamiaceae, com uma composição em óleo predominante em monoterpenos e sesquiterpenos, que inibiu os fungos *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum capsici* e o oomiceta *Phytophthora capsici*, com uma suspensão de esporos de concentração 1×10^7 esporos/mL, para valores de CMI compreendidos entre 500 e 1000 µg/mL.

No presente estudo não se observa inibição dos agentes fitopatogénicos, o que pode ser justificado pela diferente composição química dos OE ou pelas concentrações testadas não serem as mais indicadas.

5. Conclusões Gerais e Perspetivas Futuras

Dos microrganismos testados, patogénicos e/ou oportunistas para o Homem, os fungos *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula rubra*, *Tricosporon cutaneum* e a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, estirpe ATCC 6538, mostraram sensibilidade às amostras de *L. stoechas* subsp. *luisieri*, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, com interesse industrial e usada como modelo de célula eucariótica. Por sua vez, as amostras de *L. pedunculata* inibiram as leveduras *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Tricosporon cutaneum*, bem como a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), pelo que se observa uma menor eficácia das amostras deste *taxon*, justificada pela diferente composição química de OE e de extratos.

De todos os microrganismos testados, *Cryptococcus neoformans* foi o que mostrou maior sensibilidade, sendo inibido pelos OE e extratos de ambos os *taxa*. Por outro lado, observou-se que as bactérias Gram-negativas não revelaram sensibilidade às amostras, facto justificado pela constituição da parede celular das mesmas.

No ensaio com antibióticos e/ou anti-fúngicos, observou-se ainda que alguns produtos de síntese inibem os microrganismos estudados a concentrações muito elevadas (> 100 µg/mL), semelhantes a alguns valores obtidos nas CMI que não foram considerados positivos, pelo que as amostras testadas não devem ser rejeitadas de imediato mas sim estudadas a concentrações superiores.

Os agentes fitopatogénicos, bactérias e fungos, mostraram-se insensíveis às amostras testadas para as concentrações utilizadas, pelo que deveriam ser testadas concentrações mais elevadas e outra metodologia, como a técnica do meio tóxico. Também o estudo *in vivo* poderá dar diferentes resultados do *in vitro*, pelo que ambos os estudos deveriam ser concretizados e confrontados.

Para alguns ensaios de atividade biológica com agentes fitopatogénicos é necessário um maior volume de amostras, razão pela qual alguns destes ensaios foram preliminares. Por se tratar de espécies pouco estudadas mas bastante presentes no nosso país, existe interesse nos estudos de caracterização dos OE e de extratos, respetivo rendimento e eficácia como agentes antimicrobianos.

Este estudo mostra a importância da investigação dos extratos das plantas e OE, que muitas vezes são desvalorizados e que podem potencialmente ser eficazes no combate de doenças do Homem e das plantas, em substituição de antibióticos e anti-fúngicos, minimizando o risco de aparecimento de resistências. Por outro lado, estes compostos podem mostrar menos toxicidade para o homem e ambiente, pelo que devem ser estudados

como uma alternativa ao uso de pesticidas convencionais ou como fonte de modelos químicos para a síntese de novas moléculas.

No futuro, os OE e extratos de *Lavandula stoechas* ssp. *luisieri* e *L. pedunculata* devem ser testados para um maior número de microrganismos patogénicos do homem. Os agentes fitopatogénicos por outro lado, devem ser testados com concentrações mais elevadas e com diferente metodologia, por exemplo, o método do meio tóxico. Os OE e extratos devem ser bem caracterizados por quimiótipos e estudada a sua fitotoxicidade e toxicidade para o homem e para o ambiente. Com todos estes dados poder-se-á então delinir a sua possível utilização.

6. Referências

- Achkar J & Fries B (2010). *Candida* infections on the genitourinary tract. *Clinical Microbiology Reviews* **23**: 253-273.
- Andersen B, Smedsgaard J, Frisvad J (2004). *Penicillium expansum*: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 2421-2428.
- Angioni A, Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **54**: 4364-4370.
- Baldovini N, Lavoine-Hannequelle S, Ferrando G, Dusart G, Lizzani-Cuvelier L (2005). Necrodane monoterpenoids from *Lavandula luisieri*. *Phytochemistry* **66**: 1651-1655.
- Bekele J & Hasanali A (2001). Blend effects in the toxicity of the essential oil constituents of *Ocimum kilimanscharicum* and *Ocimum kenyense* (Labiatae) on two post-harvest insect pest. *Phytochemistry* **57**: 385-391.
- Blazekovic B, Stanic G, Pepeljnjak S, Vladimir-Knežević S (2011). In vitro antibacterial and antifungal activity of *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. 'Budrovka'. *Molecules* **16**: 4241–4253.
- Botelho F (2005). Alfazema – A alma da provença. *Revista Jardins*. Ano 3, **36**: 18-19.
- Boucher H, Talbot G, Bradley J, Edwards J, Gilbert D, Rice L, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* **48**: 1-12.
- Britto A, Sebastian S, Sujin R (2012). Antibacterial activity of selected species of *Lamiaceae* against human pathogens. *Indian Journal of Natural Products and Resources* **3**: 334-342.
- Cabeen M & Jacobs-Wagner C (2005). Bacterial cell shape. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 601-610.
- Camele I, Altieri L, Martino L, Feo V, Mancini E, Rana G (2012). In vitro control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oil components. *International Journal of Molecular Sciences* **13**: 2290-2300.
- Casali A, Staats C, Schrank A, Vainstein M (2001). *Cryptococcus neoformans*: aspectos moleculares e epidemiológicos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* **20**: 34-37.
- Cavanagh HMA & Wilkinson JM (2002). Biological activities of lavender essential oil. *Phytotherapy Research* **16**: 301-308.

- Chen Y, Toffaletti D, Tenor J, Litvintseva A, Fang C, Mitchell T, MacDonald T, Nielsen K, Boulware D, Bicanic T, Perfect J (2014). The *Cryptococcus neoformans* transcriptome at the site of human meningitis. *mBio* **5**: e01087-13.
- Chiam WY, Huang Y, Chen SX, Ho SH (1999). Toxic and antifeedant effects of allyl disulfide on *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal Economic Entomology* **92**: 239-245.
- Chu CJ & Kemper KJ (2001). Lavander (*Lavandula* ssp). <http://www.longwoodherbal.org/lavender/lavender.pdf>.
- Couillerot O, Prigent-Combaret C, Caballero-Mellado J, Moenne-Loccoz Y (2009). *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology* **48**: 505-512.
- Council of Europe (COE) (2007). European Directorate for the Quality of Medicines. *European Pharmacopoeia*. 6th Ed. Strasbourg.
- Cos P, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D, Maes L (2006a). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro "proof-of-concept". *Journal of Ethnopharmacology* **106**: 290-302.
- Cos P, Maes L, Sindambiwe JB, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D (2006b). *Bioassays for antibacterial and antifungal activities. Biological screening of plant constituents*. Trieste, Italy: UNIDO-ICS – United Nations Industrial Development Organization and the International Centre of Science and High Technology.
- Couillerot O, Prigent-Combaret C, Caballero-Mellado J, Moenne-Loccoz Y (2009). *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology* **48**: 505-512.
- Cowan MK & Talaro KP (2009). *Microbiology: A Systems Approach*. McGraw-Hill international edition.
- Cunha AP (2005). *Farmacognosia e Fitoquímica*. Fundação Calouste Gulbenkian. 1ª Ed. Lisboa.
- Cunha AP, Ribeiro JA, Roque OR (2009). *Plantas Aromáticas em Portugal - Caracterização e Utilizações*. Fundação Calouste Gulbenkian. 2ª Ed. Lisboa.
- Danilchanka O, Pavlenok M, Niederweis M (2008). Role of porins for uptake of antibiotics by *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**: 3127-3134.
- Dean R, Van Kan J, Pretorius Z, Hammond-Kosack K, Pietro A, Spanu P, Rudd J, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster G (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **13**: 414-430.

- Delgado FMG (2010). *Conservação e Valorização de Asphodelus bento-rainhae P. Silva e Lavandula luisieri (Rozeira) Rivas-Martínez da Beira Interior*. Tese de Doutoramento em Engenharia Agronómica, Instituto Superior de Agronomia, UTL, Lisboa.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2014). Scientific opinion on the pest categorisation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith). *EFSA Journal* **12**: 3721.
- Eisner T, Deyrup M, Jacobs R, Meinwald J (1986). Necrodols: Anti-insectan terpenes from defensive secretion of carrion beetle (*Necrodes surinamensis*). *Journal of Chemical Ecology* **12**:1407-1415.
- Eisner T & Meinwald J (1982). Defensive spray mechanism of a silphid beetle (*Necrodes surinamensis*). *Psyche* **87**: 357-367.
- Endo E, Cortez D, Ueda-Nakamura T, Nakamura C, Filho B (2010). Potent antifungal activity of extracts and pure compounds isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Research in Microbiology* **161**: 534-540.
- Evans WC (2009). *Trease and Evans Pharmacognosy*. 16th edition, Saunders Elsevier, Edinburgh, UK..
- Feijão D (2011). *A Flora Medicinal e Aromática da Herdade da Ribeira Abaixo, Grândola (Estação de Campo, CBA): Caracterização Micromorfológica e dos Óleos Essenciais de Lavandula luisieri*. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia FCUL/UL, Lisboa.
- Figueiredo AC, Barroso JG e Pedro LG (2006). Plantas Aromáticas e Medicinais. Factores que afectam a produção. In: Figueiredo AC, Barroso JG & Pedro LG (eds), *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais*, Curso Teórico-Prático (2ª Ed.), Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Aplicada, Lisboa, Portugal, pp 1-18.
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer J (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragrance Journal* **23**: 213-226.
- Franco JA (1984). *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores) Vol. II Clethraceae – Compositae*, Lisboa.
- García-Vallejo MC, García-Vallejo MI, Sanz J, Bernabe M, Velasco-Negueruela A (1994). Necrodane (1,2,2,3,4-pentamethylcyclopentane) derivatives in *Lavandula luisieri*, new compounds to the plant kingdom. *Phytochemistry* **36**: 43-45.
- García-Vallejo MC, Garcia-Vallejo MI, Velasco-Negueruela A (1990). Essential oils of genus *Lavandula* L. in Spain. In *Proceedings of the 11th International Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavours*. New Delhi, India, 12-16 November, 1989, Vol. 4 Chemistry - Analysis and Structure, 15-26.

- Gautam A, Sharma S, Avasti S, Bhadavria R (2011). Diversity, pathogenicity and toxicology of *A. niger*: An important spoilage fungi. *Research Journal of Microbiology* **6**: 270-280.
- González-Coloma A, Delgado F, Rodilla I, Silva L, Sanz J, Burillo J (2011). Chemical and biological profiles of *Lavandula luisieri* essential oils from western Iberia Peninsula populations. *Biochemical Systematics and Ecology* **39**: 1-8.
- González-Coloma A, Guardaño A, Tonn CE, Sosa ME (2005). Antifeedant/insecticidal terpenes from Asteraceae and Labiatae species native to Argentinean semi-arid lands. *Zeitschrift für Naturforschung* **60**: 855-886.
- González-Coloma A, Martín-Benito D, Mohamed N, Garcia-Vallejo MC, Soria AC (2006). Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different populations of *Lavandula luisieri* L. *Biochemical Systematics and Ecology* **34**: 609-616.
- González-Coloma A, Reina M, Cabrera R, Castañera P, Gutierrez C (1995). Antifeedant and toxic effects of sesquiterpenes from *Senecio palmensis* to Colorado potato beetle. *Journal of Chemical Ecology* **21**: 1255-1270.
- González-Coloma A, Terrero D, Perales A, Escoubas P, Fraga BM (1996). Insect antifeedant ryanodane diterpenes from *Persea indica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**: 296-300.
- GPP (Gabinete de Planeamento e Políticas). Governo de Portugal, Ministério da Agricultura e do Mar (2013). *Plantas Aromáticas Medicinais e Condimentares, Portugal Continental 2012*.
- Gutierrez C, Fereres A, Reina M, Cabrera R, González-Coloma A (1997). A behavioral and sublethal effects of structurally related lower terpenes on *Myzus persicae*. *Journal of Chemical Ecology* **23**: 1641-1650.
- Hammer K, Carson C, Riley T (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. **86**: 985-990.
- Harley RM, Atkins S, Budantsev AL, Cantino PD, Conn BJ, Grayer RJ, Harley MM, de Kok RPJ, Krestovskaja TV, Morales R, Paton AJ, Ryding PO (2004). *Labiatae*. In: K Kubitzki (ed.), JW Kadereit (vol. ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants* vol. VII. *Flowering Plants, Dicotyledons, Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae)*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp 167-275.
- He J, Baldini R, Déziel E, Sauder M, Zhang Q, Liberati N, Lee D, Urbach J, Goodman H, Rahme L (2004). The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harbouring plant and animal virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 2530-2535.

- Hossain MA, Ismail Z, Rahman A, Kang SC (2008). Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oils and crude extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth. *Industrial Crops and Products* **27**: 328-334.
- Huang Y & Ho SH (1998). Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldehyde against the grain storage insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Journal of Stored Products Research* **34**: 11-17.
- Huang Y, Zhao J, Zhou L, Wang J, Cong Y, Chen X, Guo Z, Whang Q, Jian W (2010). Antifungal activity of the essential oil of *Illicium verum* fruit and its main component trans-anethole. *Molecules* **15**: 7558-7569.
- Hull C & Heitman J (2002). Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annual Review of Genetics* **36**: 557-615.
- Hossain M, Ismail Z, Rahman A, Kang S (2008). Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oils and crude extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth. *Industrial Crops and Products* **27**: 328-334.
- Hussain A, Anwar F, Nigam P, Sarker S, Moore J, Rao J, Mazumdar A (2010). Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *LWT – Food Science and Technology* **44**: 1199-1206.
- Johnston L & Jaykus L (2004). Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 3133-3137.
- Jorge R (2012). *Ontogenia dos tricomas em cotilédones e plântulas de Lavandula pedunculata (alfazema) – Relatório de estágio de Iniciação à Investigação Científica*. Centro de Biologia Aplicada à Agricultura, Instituto Superior de Agronomia, UTL, Lisboa.
- Koul O, Walia S, Dhaliwal G (2008). Essential oils as green pesticides: Potential and constraints. *Biopesticides International* **4**: 63-84.
- Lis-Balchin M, Deans SG, Eaglesham E (1998). Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour Fragrance Journal*. **13**: 98-104.
- Lister P, Wolter D, Hanson N (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews* **22**: 582-610.
- Magro A, Matos O, Carolina M, Bastos M, Mexia A (2008). Utilização de extractos aquosos de plantas na protecção de produtos agrícolas secos armazenados. *Workshop Plantas Medicinais e Práticas Fitoterapêuticas nos Trópicos*, IICT/CCCM, 29-31 de Outubro, Lisboa.

- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanuma M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer S, Machado M, Toth I, Salmond G, Foster G (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **13**: 614-629.
- Morales R (2000). Diversidad en labiadas mediterráneas y macaronésicas. *Portugaliae Acta Biologica* **19**: 31-48.
- Morales, R. 2010. Género *Lavandula* L. In: Morales *et al.* (eds.). *Flora Iberica* vol. XII, Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid, pp 484-496.
- Moreira I, Teixeira G, Monteiro A (2010). *Anatomia das Plantas: Estruturas Secretoras*. Série Didática Botânica, ISA Press.
- Moura L, Barros C, Mourão I, Matos O (2012). Potencialidades de extratos e óleos essenciais de coentro, orégão e poejo como meio de protecção contra bacterioses do tomateiro. *Revista de Ciências Agrárias* **35**: 265-273.
- Moura L, Darrasse A, Jacques M, Duclo J (2005). Desenvolvimento e validação do Bio-PCR na detecção de *P. corrugata*, *P. mediterranea* e *P. viridiflava* em raízes e caules de tomateiro. *Actas Portuguesas de Horticultura* **7**: 144-150.
- Mulas M (2006). Traditional uses of Labiatae in the mediterranean area. *Acta Horticulturae* **723**: 25-32.
- Myers N, Mittermeier R, Mittermeier C, Fonseca G, Kent J (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**: 853-858.
- Naveed R, Hussain I, Tawab A, Tariq M, Rahman M, Hameed S, Mahmood M, Siddique A, Iqbal M (2013). Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani species against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. *BMC Complementary Alternative Medicine* **13**: 265.
- Nazarro F, Fratianni F, De Martino EL, Coppola R, De Feo V (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* **6**: 1451-1474.
- Niederweis M (2003). Mycobacterial porins - new channel proteins in unique outer membranes. *Molecular Microbiology* **49**: 1167-1177.
- Otero J, Cimino D, Patil K, Poulsen S, Olsson L, Nielsen J (2013). Industrial systems biology of *Saccharomyces cerevisiae* enable novel succinic acid cell factory. *Plos One* **8**: e54144.
- Otto M (2009). *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nature Reviews Microbiology* **7**: 555-567.
- Owusu EO (2000). Effect of some Ghanaian plant components on control of two stored-product insect pests of cereals. *Journal of Stored Products Research* **37**: 85-91.

- Pereira Coutinho AX (1939). *Flora de Portugal (Plantas Vasculares): Disposta em Chaves Dicotómicas*. 2ª Ed., Bertrand, Lisboa.
- Prins CL, Lemos CSL, Freitas SP (2006). Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). *Revista Brasileira Plantas Medicinais* **8**: 92-95.
- Riotte L (1999). *As Cenouras Amam os Tomates*. Edições Europa América.
- Roach B, Eisner T, Meinwald J (1990). Defense mechanisms of Arthropods. 83. α - and β -necrodols, novel terpenes from a carrion beetle (*Necrodes surimanensis*, Silphidae, Coleoptera). *Journal Organic Chemistry* **55**: 4047-4051.
- Saxon E, Jackson R, Bhumbra S, Smith T, Sockett R (2014). *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 guards against *Pseudomonas tolaasii* brown-blotch lesions on the surface of post harvest *Agaricus bisporus* mushrooms. *BMC Microbiology* **14**: 163.
- Shafaghat A, Salimi F, Amani-Hooshya V (2012). Phytochemical and antimicrobial activities of *Lavandula officinalis* leaves and stems against some pathogenic microorganisms. *Journal of Medicinal Plants Research* **6**: 455-460.
- Soylu EM, Kurt S, Soylu S (2010). *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology* **143**: 183-189.
- Stockwell V & Duffy B (2012). Use of antibiotics in plant agriculture. *Revue Scientifique et Technique - Office International des Epizooties* **31**: 199–210.
- Stringaro A, Vavala E, Colone M, Pepi F, Mignogna G, Garzoli S, Ceccchetti S, Ragno R, Angiolella L (2014). Effects of *Mentha suaveolens* essential oil alone or in combination with other drugs in *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, article ID 125904, 9 pages.
- Tadesse D, Zhao S, Tong E, Ayers S, Sing A, Bartholomew M, MacDermott P (2012). Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002. *Emerging Infectious Diseases* **18**: 741-749.
- Talibi I, Amkraz N, Askarne L, Msanda F, Saadi B, Boudyach E, Boubaker H, Bouizgarne B, Ait Benaoumar A (2011). Antibacterial activity of moroccan plants extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomatoes' bacterial canker. *Journal of Medicinal Plants Research* **5**: 4332-4338.
- Teixeira G, Correia AI, Vasconcelos T, Duarte A, Oliveira N, Madureira AM (2012). *Lavandula stoechas* subsp. *luisieri* and *L. pedunculata*: comparative antibacterial activity. *Journal of Phytotherapy & Pharmacology* **6**: 11-15.
- Tian J, Ban X, Zen H, He J, Chen Y, Wang Y (2011). The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus niger*. *Plos One* **7**: e30147.

- Torras J, Grau MD, López JF, Heras FX (2007). Analysis of essential oils from chemotypes of *Thymus vulgaris* in Catalonia. *Journal of Science of Food and Agriculture* **87**: 2327-2333.
- Trapp SC & Croteau RB (2001). Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* **158**: 811-832.
- Upson T (2002). The taxonomy of the genus *Lavandula* L. In: M. Lis-Balchin (Ed.), *Lavander, the Genus Lavandula*. Taylor & Francis Inc., New York, pp 2-34.
- Upson T & Andrews S (2004). *The Genus Lavandula*. Timber Press, Inc. Portland, USA.
- Villalobos MJP & Ballesta MCA (2003). Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. *Biochemical Systematic and Ecology* **31**: 673-679.
- Wagura A, Kimenju J, Giichimu B (2011). Comparative antibacterial effects of raw extracts and essential oils of *Ocimum gratissimum* L. against *Ralstonia solanacearum* (Smith). *International Journal of Plant Pathology* **2**: 144-152.
- Werker E, Ravid U, Putievsky E (1985). Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of the Labiatae. *Israel Journal of Botany* **34**: 31-45.
- Wirth F & Goldani F (2012). Epidemiology of *Rhodotorula*: An emerging pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Disease*, article ID 465717, 7 pages.
- Woronuk G, Demissie Z, Rheault M, Mahmoud S. Biosynthesis and therapeutic properties of *Lavandula* essential oil constituents. *Planta Medica* **77**: 7-15.
- Zuquarte M, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Canhoto J, Vale-Silva L, Silva MJ, Pinto E, Salgueiro L (2011). Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Hér. *Journal of Medical Microbiology* **60**: 611-618.
- Zuquarte M, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Dinis AM, Canhoto J e Salgueiro LR (2009). Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oils of *Lavandula pedunculata* (Miller) Cav. *Chemistry & Biodiversity* **6**: 1283-1292.